



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**INFLUÊNCIA DA VIA DAS QUINURENINAS NA FUNÇÃO VASCULAR
DE CAMUNDONGOS PREENHE E NÃO PREENHE EM MODELO DE
ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS**

NAYANA YARED BATISTA

MANAUS
2021

NAYANA YARED BATISTA

**INFLUÊNCIA DA VIA DAS QUINURENINAS NA FUNÇÃO VASCULAR
DE CAMUNDONGOS PRENHE E NÃO PRENHE EM MODELO DE
ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção do Grau de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

Área de concentração: Imunoquímica e Imunometabolismo.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

MANAUS
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B333i Batista, Nayana Yared
Influência da via das quinureninas na função vascular de camundongos prenhe e não prenhe em modelo de animais hiperglicêmicos : disfunção vascular gerada pela hiperglicemia desregula a via das quinureninas / Nayana Yared Batista . 2021
152 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Wilson do Nascimento Corrêa
Coorientadora: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Inflamação. 2. Disfunção Endotelial. 3. Quinurenina. 4. Diabetes. 5. Indoleamina 2,3-dioxigenase. I. Corrêa, José Wilson do Nascimento. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho

A minha mãe Fanny Yared, que me acompanha e faz do seu amor e dedicação o meu maior suporte emocional.

Ao meu pai Bianor Batista (*in memoriam*) que me incentivou a seguir em frente quando mais precisou de mim.

Ao meu esposo Weuler Arce, que com seu amor e carinho se fez sempre presente e com muita paciência esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir iniciar, desenvolver e concluir essa importante etapa da minha vida. Por me dar forças, sustento, perseverança e estar sempre ao meu lado em toda essa caminhada.

A minha mãe Fanny Yared, que me encoraja todos os dias, me fortalece e me acompanha sempre na torcida para o meu melhor. Te amo, mãe!

Ao meu pai Bianor Batista, que me incentivou a seguir em busca dos meus sonhos, mas partiu para outro plano antes de ver esse sonho realizado. Mas sei que ele torce por mim lá do céu. Obrigada por tudo, pai! Eu te amo! Te amo além da vida!

Ao meu esposo Weuler Arce, que sempre esteve ao meu lado, que com seu amor e carinho me incentivou durante todos os momentos difíceis e teve muita paciência para lidar comigo nos dias mais irritantes e ao nosso caramelo que passou muitas madrugadas acordado comigo.

A meu orientador José Wilson do Nascimento Corrêa, que desde a minha banca de qualificação do mestrado têm me ajudado a trilhar esse caminho na pesquisa e docência. São anos de uma relação que tem me feito crescer cada vez mais! Muito obrigada por todas as portas que o senhor me ajudou a abrir! Não tenho palavras para demonstrar o quanto sou grata!!

A minha co-orientadora Rita Tostes, por me receber em seu laboratório, me permitir realizar a parte experimental dessa pesquisa e por compartilhar seus conhecimentos. Você é uma mulher, educadora, pesquisadora e cientista inspiradora! Muito obrigada, sou fã e já falei várias vezes!

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Experimental da UFAM, Kadmiel, Carol, Sandra e, especialmente, ao Everton por toda ajuda no desenvolvimento das revisões.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto por todo apoio na realização dos ensaios experimentais, em especial professor Fernando Carneiro e ao Alecsander Bressan.

A Técnica Giuliana Bertozi por toda a ajuda, cuidado, suporte e amizade em todos os momentos em que precisei. Você um grande presente para mim!

Aos meus queridos dona Samira e Seu Reginaldo por me receberem, cuidarem tão bem de mim e, principalmente, por terem sido a família de coração que eu precisava.

A instituição Nilton Lins pela liberação e suporte que me deu enquanto eu estava ausente desenvolvendo este projeto, em especial a vice reitora Professora Karla Liliam Pedrosa por todo o apoio nesse processo.

Aos meus queridos amigos Felipe, Alessandro e Zinalton pelo grupo que criamos para discutir ciência, mas principalmente, pela grande amizade que surgiu entre nós.

A todos os Professores que fazem parte do PPGIBA e contribuíram para meu crescimento nessa área tão fascinante que é a Imunologia.

Aos colegas da turma de mestrado e doutorado por todo compartilhamento de conhecimento e pela caminhada tão importante.

As amigas de sempre, Elenn, Wania, Poliane, Naiara, Carina, Evelane e Evelin, que mesmo com caminhos tão diferentes, sempre damos um jeito de nos conectarmos. Amo todas!!

Aos meus queridos alunos Alcenir, Peterson e Juan por toda a ajuda nas etapas finais do doutorado.

A FAPEAM (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado.

Meu agradecimento especial aos professores das bancas avaliadoras pela contribuição para as melhorias do meu trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram pra que meu sonho se realizasse. Agradeço de todo coração!!!

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!

(Chico Xavier)

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) está entre as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) mais prevalentes no Brasil e no mundo, não somente por causa dos agravos a saúde da população, mas também devido a sua alta taxa de mortalidade. Quando acontece no estado gravídico, pode comprometer a vida da mãe e o desenvolvimento fetal, bem como predispor a mãe ao desenvolvimento do DM2. Alterações macro e microvasculares presentes nessa patologia, além de ativação de vias inflamatórias que culminam no quadro de disfunção vascular, vêm sendo relacionadas a níveis alterados de metabólitos oriundos da via da quinureninas. Esta via, resulta do metabolismo do triptofano por enzimas como a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), cuja expressão encontra-se aumentada em condições inflamatórias. Nesse sentido, o presente estudo teve como finalidade investigar a relação da via das quinureninas com as adaptações vasculares associadas à gravidez e sua relação com os distúrbios vasculares induzidos pela hiperglicemia em artérias de camundongos prenhe e não prenhe. Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizados camundongos fêmeas para compor quatro grupos experimentais: normoglicêmicas, hiperglicêmicas, prenhe normoglicêmicas e prenhe hiperglicêmicas (n=10/grupo). Os animais do grupo hiperglicêmico foram submetidos a uma dieta hipercalórica durante 3 meses. Nesse período receberam duas doses de estreptozotocina (100mg/kg) com intervalo de uma semana entre as aplicações. Os animais do grupo prenhe hiperglicêmico foram submetidos a uma dieta hipercalórica durante o mês que antecedeu o acasalamento e durante os 21 dias da prenhez. A hiperglicemia foi confirmada com as dosagens glicêmicas de animais em jejum de 6h. Em todos os grupos foi realizado os ensaios de reatividade vascular, no qual foram avaliadas a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina e vasodilatadora induzida por acetilcolina em anéis de aorta de camundongos previamente incubadas com inibidores da indoleamina2,3-dioxigenase (IDO) e quinurenina mono-oxigenase (KMO) ou com metabólitos oriundos da via: L-quinurenina (KYN), ácido quinurênico (Ac. KYN) e 3-hidroxiquinurenina (3HKYN). Nossos resultados evidenciaram que a via das quinureninas desempenham importante ação na regulação do tônus vascular dos quatro grupos experimentais. Essa regulação foi direcionada a uma diminuição da resposta vascular ao vasoconstritor fenilefrina. Além disso, evidenciamos também que perfil de ativação da via difere nos grupos avaliados. A ação do ácido quinurênico foi mais expressiva na prenhez e a quinurenina na prenhez hiperglicêmica. Enquanto que na condição não prenhe, sugerimos que outros metabólitos, não avaliado neste estudo, podem desencadear essa ação reguladora da vasculatura, uma vez que a incubação com os inibidores promoveu alterações vasculares, e o mesmo não foi visto com os metabólitos analisados.

Palavras-chaves: Inflamação; Disfunção Endotelial; Quinurenina, Diabetes, indoleamina 2,3-dioxigenase.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is among the most prevalent chronic non-communicable diseases (NCDs) in Brazil and around the world, not only because of the damage to the population's health, but also because of its high mortality rate. When it happens in the pregnant state, it can compromise the mother's life and fetal development, as well as predispose the mother to the development of DM2. Macro and microvascular alterations present in this pathology, in addition to activation of inflammatory pathways that culminate in vascular dysfunction, have been related to altered levels of metabolites from the kynurenine pathway. This pathway results from tryptophan metabolism by enzymes such as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), whose expression is increased in inflammatory conditions. Thus, the present study aimed to investigate the relationship of the kynurenine pathway with vascular adaptations associated with pregnancy and its relationship with vascular disorders induced by hyperglycemia in mouse arteries. To carry out the experimental protocols, female mice were used to compose four experimental groups: normoglycemic, hyperglycemic, normoglycemic pregnant and hyperglycemic pregnant (n=10/group). The animals in the hyperglycemic group were submitted to a hypercaloric diet for 3 months. During this period, they received two doses of streptozotocin (100mg/kg) with an interval of one week between applications. The animals in the hyperglycemic pregnant group were submitted to a hypercaloric diet during the month before mating and during the 21 days of pregnancy. Hyperglycemia was confirmed with the glycemic dosages of animals fasting for 6h. All groups went through essays of vascular reactivity, in which the vasoconstrictor response induced by phenylephrine and vasodilator induced by acetylcholine in aortic rings of mice, which were previously incubated with inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and kynurenine mono-oxygenase (KMO) or with metabolites from the pathway: L-kynurenine (KYN), kynurenic acid (Ac. KYN) and 3-hydroxykynurenine (3HKYN). Our results showed that the kynurenine pathway plays an important role in regulating vascular tone in the four experimental groups. This regulation was directed to a decrease in the vascular response to the vasoconstrictor phenylephrine. In addition, we also evidenced that the pathway activation profile differs in the evaluated groups. The action of kynurenic acid was more expressive in pregnancy and kynurenine in hyperglycemic pregnancy. While in the non-pregnant condition, we suggest that other metabolites, not evaluated in this study, may trigger this vasculature regulating action, since incubation with the inhibitors promoted vascular changes, and the same was not seen with the analyzed metabolites.

Keywords: Inflammation; Endothelial Dysfunction; Kynurenine, Diabetes, indoleamine 2,3-dioxygenase.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE QUADROS E TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Artigo 1 – Desenvolvimento Saudável e Complicações Gestacionais decorrentes da ativação da via das Quinureninas: Uma revisão Sistemática	21
2.1.1 RESUMO.....	21
2.1.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO.....	22
2.1.3 METODOLOGIA.....	25
2.1.4 REULTADOS.....	26
2.1.5 DICUSSÃO.....	37
2.1.6 CONCLUSÕES.....	42
2.1.7 REFERÊNCIAS.....	42
2.2 Artigo 2 – Efeitos da Ativação da Via das Quinureninas no Desenvolvimento do Diabetes mellitus: Dados de uma Metanálise	45
2.2.1 RESUMO.....	45
2.2.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO.....	45
2.2.3 METODOLOGIA.....	49
2.2.4 REULTADOS.....	50
2.2.5 DICUSSÃO.....	61
2.2.6 CONCLUSÕES.....	64
2.2.7 REFERÊNCIAS.....	65
2.3 Artigo 3 – Desregulação na via das quinureninas como potencial marcador de desordens vasculares na gestação hiperglicêmica: artigo de hipótese	68
2.3.1 RESUMO.....	68
2.3.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO.....	68
2.3.3 HIPÓTESE.....	71
2.3.4 FUNDAMENTAÇÃO DA HIPÓTESE.....	73
2.3.5 CONCLUSÕES.....	75
2.3.6 REFERÊNCIAS.....	75
2.4 Artigo 4 - Disfunção Vascular em Modelos Experimentais de Diabetes Mellitus Tipo 2 em Ratos: Uma Revisão Sistemática	78
2.4.1 RESUMO.....	78
2.4.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO.....	78

2.4.3 METODOLOGIA	84
2.4.4 REULTADOS.....	85
2.4.5 DICUSSÃO	94
2.4.6 CONCLUSÕES.....	97
2.4.7 REFERÊNCIAS	98
3. JUSTIFICATIVA	102
4. OBJETIVOS.....	104
4.1 Objetivo geral	104
4.2 Objetivos específicos.....	104
5. MATERIAL E MÉTODOS	105
5.1 Animais	105
5.2 Grupos Experimentais	105
5.3 Acompanhamento do ciclo estral	106
5.4 Acasalamento e Prenhez	106
5.5 Indução da Hiperglicemia	106
5.6 Teste de Tolerância a Insulina.....	107
5.7 Peso dos animais	107
5.8 Reatividade vascular.....	107
5.9 Protocolos experimentais.....	109
5.10 Análise estatística	110
6. RESULTADOS	111
6.1 Efeitos da hiperglicemia em camundongos não prenhe e no desenvolvimento da prenhez	111
6.2 Efeitos de inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos normoglicêmicas.....	113
6.4 Efeitos dos inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe.....	116
6.5 Efeitos dos inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe hiperglicêmicas.	118
6.6 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos fêmeas normoglicêmicas não prenhes.....	122
6.7 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos hiperglicêmicas não prenhe.	123
6.8 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe normoglicêmicas.	125
7.9 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe hiperglicêmicas.	126
7.10 Comparações entre grupos dos efeitos dos metabólitos da via das quinureninas sobre a reatividade vascular à fenilefrina e acetilcolina	128
7. DISCUSSÃO	132

8. CONCLUSÕES	142
9. EQUIPE CIENTÍFICA	144
REFERÊNCIAS	145
ANEXOS	149
Anexo 1 - Artigo: Relationship between metabolites levels of the kynurenine pathway and type 2 diabetes mellitus: results from a meta-analysis. (Comprovante de submissão)	149
Anexo 2 - Artigo: Methodological evaluation of vascular dysfunction in diabetes type 2 model: a Systematic Review (Comprovante de submissão)	150
Anexo 3 – Premiação no V Simpósio Biologia Vascular	151
Anexo 4 - Guia de acompanhamento para melhor compreensão dos resultados.	152
Anexo 5 - Aprovação do comitê de ética	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do útero humano em duas situações distintas: útero não gravídico e gravídico.....	22
Figura 2 -	Principais metabólitos e enzimas envolvidas no metabolismo do triptofano.....	23
Figura 3 -	Diagrama PRISMA mostrando o método de seleção de elegibilidade dos artigos incluídos no estudo sobre gestação e via das quinureninas.....	26
Figura 4 -	Figura esquemática dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do Diabetes tipo 1 e Diabetes tipo 2.....	45
Figura 5 -	Diagrama PRISMA mostrando o método de seleção de elegibilidade dos artigos incluídos no estudo sobre diabetes tipo 2 e via das quinureninas.....	50
Figura 6 -	Meta-análise da diferença de média padronizada dos de TRP e Quinurenina.....	56
Figura 7 -	Meta-análise da diferença de média padronizada dos de Ácido quinurênico, Ácidoantranílico, 3-hidroxiquinurenina, Ácido 3-hidroxi-antranílico.....	57
Figura 8 -	Atividade da IDO obtida a partir da razão Quinurenina/Triptofano.....	58
Figura 9 -	Procedimento para o rastreamento do Diabetes gestacional.....	69
Figura 10 -	Esquema representativo da ação da via das quinureninas na gestação, fundamentando a hipótese do perfil das quinureninas para compensar os danos causados pelo diabetes gestacional.....	72
Figura 11 -	Estrutura da parede arterial e esquema da regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico através de diferentes vias de sinalização que resultam no relaxamento da musculatura lisa vascular	80
Figura 12 -	Diagrama PRISMA mostrando o método de seleção de elegibilidade dos artigos incluídos no estudo sobre indução modelos experimentais de diabetes.....	85
Figura 13 -	Frequência de artigos (2005-2020) avaliando métodos de indução de DM2 e comprometimento vascular em modelos animais.....	87
Figura 14 -	Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria aorta para a realização dos estudos de reatividade vascular in vitro.....	107
Figura 15 -	Esquema representativo das curvas que avaliam a viabilidade do músculo liso vascular, integridade funcional do endotélio e curvas de concentração-efeito.....	109
Figura 16 -	Níveis glicêmicos de animais não prenhe e animais prenhe hiperglicêmicos.....	110
Figura 17 -	Ganho de massa corporal de animais não prenhe e prenhe antes e após o tratamento com a dieta hiperlipídica.....	111
Figura 18 -	Impacto do consumo da dieta hiperlipídica no desenvolvimento fetal de camundongos.....	111
Figura 19 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas.....	112

Figura 20 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em artérias aórticas de camundongos pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.....	113
Figura 21 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas hiperglicêmicas.....	114
Figura 22 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em artérias aórticas de camundongos hiperglicêmicas pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.....	114
Figura 23 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas prenhe.....	115
Figura 24 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em artérias aórticas de camundongos prenhe pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.....	116
Figura 25 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas prenhe hiperglicêmicas.....	117
Figura 26 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em artérias aórticas de camundongos prenhe hiperglicêmicas pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.....	117
Figura 27 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas.....	120
Figura 28 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.....	121
Figura 29 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas hiperglicêmicas.....	122
Figura 30 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.....	122
Figura 31 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas prenhe.....	123
Figura 32 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em artérias em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.....	124
Figura 33 -	Curvas concentração-efeito obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas prenhe hiperglicêmicas.....	125
Figura 34 -	Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.....	125

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Descrição sumária dos estudos incluídos para compor a revisão sistemática, evidenciando as principais comorbidades associadas a gestação.....	28
Quadro 2 -	Desenho dos artigos evidenciando os protocolos utilizados e marcadores investigados.....	29
Quadro 3 -	Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na revisão.....	35
Quadro 4 -	Desenho dos artigos evidenciando os protocolos utilizados e marcadores investigados.....	53
Quadro 5 -	Principais resultados encontrados nos artigos, demonstrando o envolvimento da via das quinureninas no quadro diabético.....	55
Quadro 6 -	Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na revisão.....	59
Quadro 7 -	Descrição sumária dos estudos incluídos na revisão sistemática.....	85
Tabela 1 -	Expressão e atividade da IDO no plasma e placenta em diferentes estágios da gravidez normal ou com comorbidades associadas.....	30
Tabela 2 -	Dosagem dos níveis de triptofano e quinurenina no plasma e placenta de mulheres grávidas normais ou com comorbidades associadas.....	31
Tabela 3 -	Níveis dos metabólitos da via das quinureninas a partir do catabolismo do Triptofano no plasma e placenta de mulheres grávidas normais ou com comorbidades associadas.....	33
Tabela 4 -	Dados sociodemográficos extraídos dos artigos incluídos na metanálise.....	52
Tabela 5 -	Níveis de Triptofano e metabólitos da via das quinureninas em pacientes diabéticos do tipo 2.....	54
Tabela 6 -	Função vascular em DM2 induzido por baixa dose de STZ associado a administração oral de frutose, dieta hiperlipídica (DH) ou ambos.....	88
Tabela 7 -	Função vascular em DM2 de animais geneticamente modificados.....	89
Tabela 8 -	Função vascular em DM2 induzido por alta dose of STZ (50-65 mg/kg).....	90
Tabela 9 -	Função vascular de animais diabéticos avaliados pela mudança nas concentrações de óxido nítrico aórtico.....	92
Tabela 10 -	Efeitos da inibição da via das quinureninas nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora de camundongos não prenhe e prenhe em condições normo e hiperglicêmicas.....	119
Tabela 11 -	Efeitos dos metabólitos da via das quinureninas nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora de camundongos não prenhe e prenhe em condições normo e hiperglicêmicas.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido antranílico	EROs: Espécies reativas de oxigênio
ADA: Associação américas de diabetes	GLUT-4: Transportadore de glicose - 4
ADRF: Fator relaxante derivado do tecido adiposo	GMPc: Guanosina mono fosfato cíclico
AX: Ácido xanturênico	GTP: Guanosina trifosfato
Ach: Acetilcolina	ICAM: Intercellular adhesion aolecule1
Ac. KYN: Ácido quinurênico	IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenase
ADP: Adenosina difosfato	IFNγ: Interferon gama
AQ: Ácido quinolínico	I-KMO: Inibidor da quinurenina monoaminoxidade
Cav-1: Caviolina-1	IL-1: Interleucina - 1
CEUA: Comitê de ética do Uso do animal	IL11: Interleucina - 11
CG: Cromatografia gasosa	IL1β: Interleucina - 1beta
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal	IL-4: Interleucina - 4
DH: Dieta Hiperlipídica	IL-6: Interleucina - 6
DM: Diabetes mellitus	IL-10: Interleucina - 10
DM1: Diabetes mellitus tipo 1	IL-11: Interleucina - 11
DM2: Diabetes mellitus tipo 2	IRS-1: Substrato 1 dos receptores de insulina
DMG: Diabetes mellitus gestacional	KAT: Quinurenina-amino-transferase
EPM: Erro padrão da média	KMO: Quinurenina-3-monooxigenase
EC₅₀: Concentração efetiva média	KYN: Quinurenina
EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio	Ac. KYN: Ácido quinurênico
EDRF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio	L-KYN: L-quinurenina
ELISA: Imunoensaio enzimático	LPS: Lipopolissacarídeos
Emax: Resposta máxima	MC: Média combinada
e-NO: Oxido nítrico endotelial	NFKB: Fator de transcrição nuclear Kappa B
e-NOS: Oxido nítrico sintase endotelial	NHLBI: National Heart, Lung, And Blood Institute
	NK: <i>Células natural killer</i>

NMDA: N-metil D-Aspartato

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

OMS: Organização Mundial da Saúde

PGI-2: Prostaglandina-I2

PA: Pressão arterial

PE: pré-eclâmpsia

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis

PVAT: Tecido adiposo perivascular

RCF: Restrição de crescimento fetal

TDO: Triptofano 2,3-dioxigenase

QUINA: Ácido Quinolínico

SBD: Sociedade brasileira de diabetes

SM: Síndrome metabólica

STZ: Espetreozotocina

Phe: Fenilefrina

TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa

TOTG: Teste oral de tolerância a glicose

TRP: Triptofano

VCAM: Vascular cell adhesion protein 1

1-MT: 1-metil-triptofano

3HAA: Ácido-3-hidroxiantranílico

3HK: 3-hidroxiquinurenina

1. INTRODUÇÃO

O triptofano (TRP), aminoácido essencial para o organismo, é utilizado para a síntese de proteínas e a biossíntese de diversos compostos biológicos (YUASA et al., 2012). Possui dois destinos metabólicos importantes, a biossíntese da serotonina e melatonina, pela cascata enzimática que se inicia com a ação da enzima triptofano hidroxilase, ou pode ser catalisado pela Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), através da via das quinureninas, sendo esta última a responsável por cerca de 95% do catabolismo periférico do triptofano livre (PETERS, 1991).

O gene da IDO é expresso com mais frequência em tecidos que possuem grande porção de mucosa, como o trato gastrointestinal e pulmão, mas também aparece em diferentes tipos celulares, entre eles no cordão umbilical, células de linhagem mielóide, fibroblastos, células estromais, hematopoiéticas, tumorais, linfóides e células dendríticas, endotélio e placenta (KING & THOMAS, 2007; HUANG et al., 2013).

A enzima IDO, fator iniciante da rota metabólica das quinureninas, produz uma série de metabólitos ativos, chamados de quinureninas (KYN). Polyzos e Ketelhuth (2015) demonstraram o envolvimento da IDO na imunotolerância, atuando como um mecanismo homeostático em processos inflamatórios excessivos. O aumento da expressão de IDO nesta condição, se deve ao aumento de Interferon-gama (IFN γ), potente indutor da expressão desta enzima (SCHROCKSNADEL et al., 2006).

Durante a gravidez, a demanda por triptofano em corpos maternos e embrionários aumenta e seu metabolismo varia ao longo do tempo na mãe e no feto (KEATON et al., 2019). Badawy, Namboodiri e Moffett (2016) demonstraram que a depleção de triptofano que ocorre durante a gravidez normal é uma consequência do consumo de triptofano pela enzima IDO. A atividade da IDO na placenta humana é alta e leva à inibição da proliferação de células T, impedindo assim a rejeição do tecido fetal pelo sistema imunológico materno (TATSUMI et al., 2000; SCHROCKSNADEL et al., 2003).

Nos últimos anos, vários estudos vêm relatando uma forte associação da redução da atividade da via das quinureninas com quadros de restrição de

crescimento fetal (ZARDOYA et al., 2018), pré-eclampsia (KEATON et al., 2019) e aborto espontâneo recorrente (ZONG et al., 2016) devido a significativa redução nos níveis plasmáticos e placentários de IDO, bem como de importantes metabólitos da via, como a quinurenina e o ácido quinurênico (GROZDICS et al., 2014; KEATON et al., 2019). Pouco se conhece sobre o comportamento da via das quinureninas no diabetes gestacional. Dados da literatura neste sentido ainda são escassos.

Condições hiperglicêmicas durante a gravidez constituem hoje um relevante problema de saúde por riscos relacionados tanto ao feto, quanto à mãe, e para o desenvolvimento de doenças futuras como a obesidade (ADA, 2014). O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é definido pela American Diabetes Association (ADA) como qualquer grau de intolerância à glicose durante a gravidez.

Para mulheres, o antecedente obstétrico de DMG é o principal fator de risco para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) e da síndrome metabólica após a gravidez (Organização Pan-Americana de Saúde, 2016). Nessa condição, caracterizada principalmente pela desregulação no metabolismo da glicose, a disfunção endotelial se apresenta como um complexo quadro que pode agravar o estado inflamatório e contribuir para o desenvolvimento de outras patologias como a dislipidemia e a hipertensão arterial (LAHOZA e MOSTAZAA, 2007).

A perda das propriedades do endotélio vascular causa migração e proliferação de células musculares lisas, agregação de plaquetas, adesão de monócitos e síntese de citocinas inflamatórias, com o aumento nos níveis de Fator de necrose tumoral-alfa TNF- α (interleucina pró-inflamatórias) e IFN- γ , o mais potente indutor da IDO, resultando numa ação vasodilatadora/constritora comprometida (BERTOLUCI, 2008). Dessa forma, essas evidências sugerem que o aumento na expressão de IDO, induzido por IFN- γ , e o consequente aumento da razão quinurenina/triptofano, podem ser indicativos de disfunção endotelial em pacientes diabéticos, uma vez que há uma maior produção de IFN- γ nessas condições.

Ante o exposto, onde as evidências indicam o envolvimento da via das quinureninas na promoção da imunotolerância durante uma gestação saudável, assim como sua ação no mecanismo homeostático contra reações imunes excessivas de quadros inflamatórios crônicos, como o diabetes. É de grande importância o

entendimento do comportamento desta via no diabetes gestacional, onde o organismo vai requerer a ativação da via para diferentes regulações.

Assim, com o objetivo de entender os efeitos da via das quinurêninas na resposta vascular no quadro diabético, na gravidez normal e diabética, realizamos uma busca sistemática da literatura, classificada atualmente como topo da pirâmide da evidência científica, e dividimos o referencial teórico da presente tese em quatro revisões sistemáticas e/ou metanálises que abrangem o tema proposto.

A revisão sobre a via das quinureninas e gestação teve como objetivo determinar o perfil de ativação da via das quinureninas, pela IDO, no desenvolvimento normal da gestação e sua relação com as complicações relacionadas a gravidez (pagina 20). Já a revisão, cujo foco foi a relação da via com o diabetes, teve como objetivo determinar o perfil de ativação da via das quinureninas e sua relação com o desenvolvimento e complicações associadas ao DM2 (página 44). E, finalmente, fundamentado nos resultados encontrados com as duas revisões, foi realizado um artigo de hipótese, cujo objetivo foi associar o perfil de ativação da via com as duas condições avaliadas neste estudo: gestação diabética (página 67).

No intuito de definir o melhor protocolo de indução de diabetes experimental, foi realizada uma revisão sistemática envolvendo modelos de animais diabéticos que refletissem disfunções vasculares semelhantes às que acontecem em seres humano (página 77). Além disso, realizamos ensaios experimentais de reatividade vascular utilizando inibidores e metabólitos da via das quinureninas em animais saudáveis, hiperglicêmicos, prenhe saudáveis e prenhe hiperglicêmicos para avaliar papel da via das quinureninas sobre a função vascular nestas condições experimentais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Artigo 1 – Desenvolvimento Saudável e Complicações Gestacionais decorrentes da ativação da via das Quinureninas: Uma revisão Sistemática

2.1.1 RESUMO

O organismo feminino passa por várias adaptações fisiológicas para ocorrer o desenvolvimento saudável do feto. Um quadro inflamatório leve no início, seguido de uma tolerância imunológica durante toda a gestação são essenciais para que essas adaptações aconteçam. Resposta excessiva ou diminuída da inflamação e supressão da resposta imune, pode gerar graves complicações para o feto e para a mãe. A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), enzima que cataboliza o Triptofano (TRP) em quinureninas, está associada à regulação de processos inflamatórios, infecciosos e imunossupressores. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar resultados já publicados na literatura para determinar o perfil de ativação da via das quinureninas e atividade da IDO no desenvolvimento normal da gestação e sua relação com as complicações mais recorrentes durante a gravidez. Para isso, foi realizado um protocolo de elaboração de revisões sistemáticas e metanálises. Dois pesquisadores calibrados realizaram uma busca sistemática da literatura de artigos publicados e enquadrados em critérios pré-definidos. Após a triagem, 11 estudos se adequaram à proposta e compuseram a presente revisão. Os estudos selecionados focaram principalmente em IDO e sua regulação no quadro gravídico. Níveis de IDO, TRP e metabólitos da via das quinureninas foram extraídos dos estudos para as devidas análises. Os dados não foram suficientes para a realização de metanálise, no entanto, após a compilação dos dados, foi evidenciado que a expressão e atividade da IDO desempenha importante papel na manutenção da gravidez saudável. Níveis reduzidos de IDO foram associados a complicações gestacionais como aborto espontâneo recorrente (AER), restrição de crescimento fetal (RCF) e pré-eclâmpsia (PE) pela quebra da tolerância materno fetal. Em relação ao TRP, foi evidenciado que este aminoácido desempenha ação vasodilatadora na microcirculação da placenta dependente dos níveis de IDO. Desse modo, alterações no catabolismo do TPR também foram associadas a comorbidades pela diminuição da demanda de substâncias essenciais ao feto. Entre os metabólitos analisados, foi sugerido aumento do catabolismo da quinurenina direcionado à maior síntese de ácido quinurênico em comorbidades associadas a gravidez. Isto pode ser observado na resposta compensatória do organismo em atenuar os efeitos das comorbidades AER, RCF e PE, já que vários relatos apontam que esse metabólito apresenta atividade protetora ao organismo. Dessa maneira, os resultados encontrados nessa revisão sistemática fornecem dados que demonstram que a desregulação na via das quinureninas pode predispor a grávida a um maior risco de aborto espontâneo recorrente, restrição de crescimento fetal e/ou pré-eclâmpsia. Futuros estudos são requeridos para validação destes achados.

2.1.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO

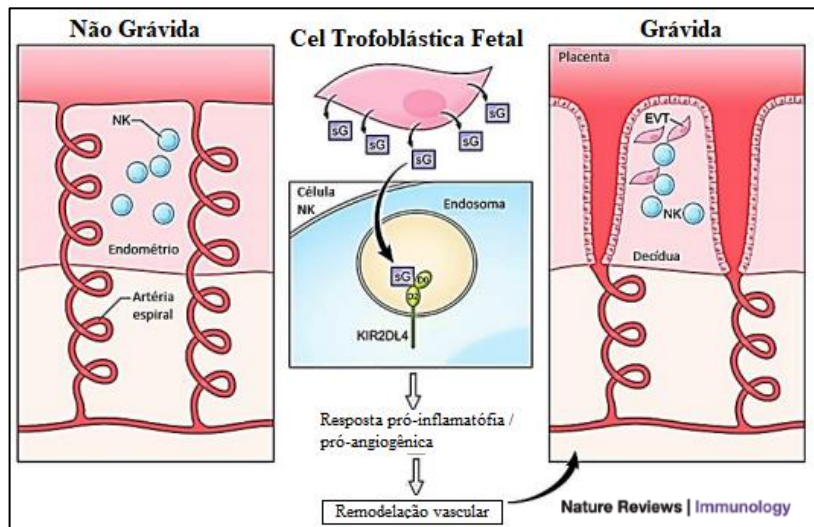
Durante o período gestacional, o organismo feminino passa por uma série de adaptações fisiológicas que começam após a concepção e afetam vários sistemas orgânicos do corpo (SOMA et al., 2016). Os sistemas cardiovascular, respiratório, hematológico, renal, gastrointestinal e endócrino passam por importantes alterações fisiológicas e adaptações que garantem um ambiente ótimo para o crescimento e desenvolvimento fetal (KAZMA et al., 2020), além de permitir que a mãe e o feto sobrevivam às exigências do parto (LONGO, 2018).

O sistema imunológico também desempenha um papel fundamental na relação materno-fetal (LI et al., 2020). A formação da decídua, que começa após a ovulação do ciclo menstrual e avança até o primeiro trimestre de gravidez, seguida da invasão trofoblástica (Figura 1) e implantação uterina evoluem de uma reação inflamatória leve, mas significativa, que permite o estabelecimento e manutenção de uma gravidez viável (YANG, ZHENG & JIN, 2019; XU et al., 2021). Esses eventos regulam o epitélio do endométrio, os vasos sanguíneos e o estroma (PALM et al., 2013).

O desenvolvimento da decídua estimula a produção de fatores como a Ativina-A, Procinectina-1, Interleucina-11 (IL-11) e a Prolactina, mediadores que atuam desde o primeiro trimestre da gestação até à formação completa da placenta (ALI et al., 2021). O processo de decidualização é importante para regular a invasão do trofoblasto e estabelecer um ambiente adequado de citocinas e imunomoduladores no estroma, promovendo a remodelação das artérias espiraladas para permitir maior fornecimento de sangue para o feto (LIU et al., 2017).

A invasão trofoblástica, neste processo, está intimamente associada à presença de células *Natural Killer* (NK) para que o trofoblasto possa invadir a decídua. As interações entre células fetais e células NK na decídua resultam em um mecanismo pró-inflamatório que leva a uma resposta pró-angiogênica para promover as adaptações vasculares no início da gravidez. O desenvolvimento da circulação placentária é assegurado então pelas modificações estruturais das artérias espiraladas, devido à dilatação e aumento do fluxo sanguíneo materno e, conseqüente, diminuição da pressão (XU et al., 2021).

Figura 1 - Representação esquemática do útero humano em duas situações distintas: útero não gravídico, onde é possível identificar as artérias totalmente espiraladas, e após a invasão trofoblástica no útero gravídico, onde a presença das células NK promove um processo inflamatório com posterior angiogênese, que resulta no remodelamento das artérias espiraladas.



(Adaptado de Bel, 2004).

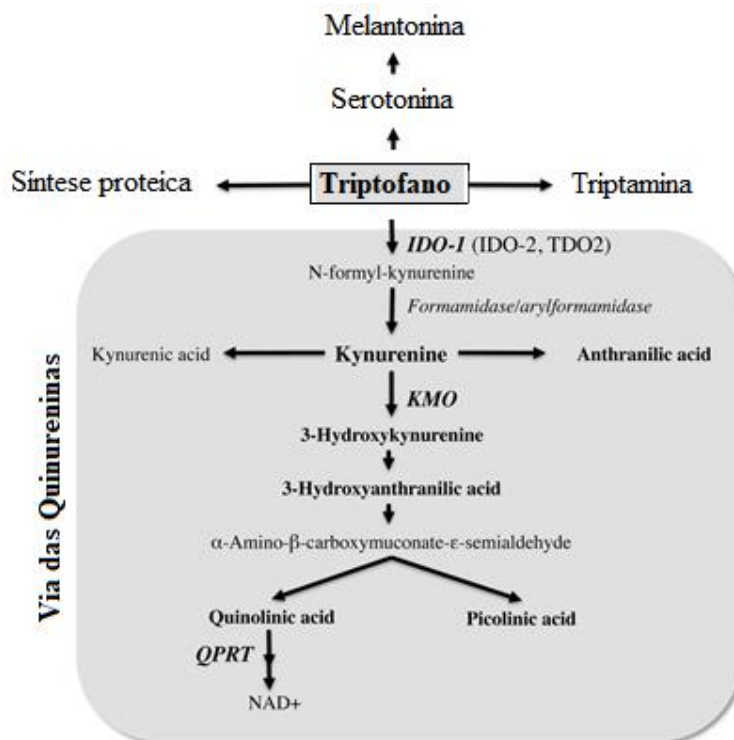
O catabolismo do Triptofano (TRP), aminoácido utilizado para a síntese de diversos compostos essenciais, também está envolvido na manutenção da gravidez (IWAHASHI et al. 2017). A demanda por TRP em corpos maternos e embrionários aumenta para promover a regulação da tolerância materno-fetal (KEATON et al., 2019). Na gestação saudável, o TRP é distribuído em trofoblastos placentários e catabolizados pela enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (BAN et al., 2013).

Este aminoácido possui destinos metabólicos importantes no organismo humano, tais como a biossíntese da serotonina e melatonina, pela cascata enzimática que se inicia com a ação da enzima triptofano hidroxilase, ou pode ser catalisado pelas enzimas IDO (1 e 2) e Triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), dando origem a via das quinureninas (Figura 2). A TDO encontra-se em tecidos hepático e IDO em tecidos extra-hepáticos, ambas são responsáveis pelo catabolismo periférico de cerca de 95% do triptofano livre (GROZDICS et al., 2014).

O gene da IDO é expresso com maior frequência em tecidos que possuem grande porção de mucosa, como o trato gastrointestinal e pulmão, mas também aparece em diferentes tipos celulares, entre eles no cordão umbilical, células de linhagem mielóide, fibroblastos, células estromais, endoteliais, hematopoiéticas, tumorais, linfóides e células dendríticas (KING & THOMAS, 2007; HUANG et al., 2013; PORTUGUEZ & SUTPHIN, 2020).

A reação enzimática mediada pela IDO/TDO ocorre pela redução eletrônica do átomo de ferro presente no grupo heme que sai do seu estado férrico (Fe^{3+}) para o estado ferroso (Fe^{2+}), facilitando a ligação do triptofano e do íon superóxido ao sítio enzimático, com sua posterior oxidação (NELP et al., 2018). Metabólitos ativos originados a partir do catabolismo do triptofano pela ação das enzimas IDO/TDO são denominados de quinureninas. Essa cascata de ativação gera, primeiramente, a quinurenina (KYN) e uma gama de produtos secundários, os quais apresentam diferentes atividades biológicas (POLYZOS & KETELHUTH, 2015).

Figura 2 - Principais metabólitos e enzimas chave envolvidas no metabolismo do triptofano.



(Adaptado de Polyzos & Ketelhuth, 2015).

O segundo e terceiro trimestres da gestação são caracterizados por uma mudança do equilíbrio inflamatório em direção ao perfil anti-inflamatório (ALI et al., 2021). Uma disfunção imunológica local induzida pela redução da atividade da IDO pode resultar em um desequilíbrio das vias angiogênicas ou inflamação excessiva (IWAHASHI et al., 2017). Ban e colaboradores (2013) demonstraram que essa desregulação pode contribuir para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia, com hipertensão e proteinúria, e aborto espontâneo recorrente.

Ante o exposto, a presente revisão tem como objetivo caracterizar o comportamento da via das quinureninas durante o desenvolvimento de uma gestação saudável, bem como relacionar alterações na via com as doenças mais recorrentes no quadro gravídico. Tais achados podem contribuir para a elucidação do mecanismo pelo qual ocorre o processo tolerogênico, ainda não tão claro, desenvolvido pelos complexos metabólitos oriundos dessa via.

2.1.3 METODOLOGIA

Para a realização deste estudo, seguiu-se o protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis), o qual delinea as etapas para o desenvolvimento de uma revisão sistemática e meta-análise (MOHER et al., 2009).

Critérios de inclusão

Os estudos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: (I) Estudos clínicos (II) Um grupo que apresentasse um quadro de gravidez normal (III) Determinação, por meio de parâmetros laboratoriais, dos níveis de quinurenina (IV) Comparação dos níveis de quinurenina de grávidas com não grávidas ou grávidas com comorbidades associadas.

Busca Sistemática

A busca sistemática foi realizada por dois pesquisadores calibrados nas bases de dados MEDLINE (National Library of Medicine), SCIENCE DIRECT e GOOGLE SCHOLAR, utilizando a combinação das seguintes palavras-chave: “*Pregnancy*”, “*Kynurenine pathway*” e “*Immunotolerance*”. A busca utilizou artigos publicados antes de 05 de janeiro de 2021. Não houve restrição de idioma na busca sistemática e as referências dos estudos foram analisadas para identificar possíveis estudos adicionais.

Extração de dados

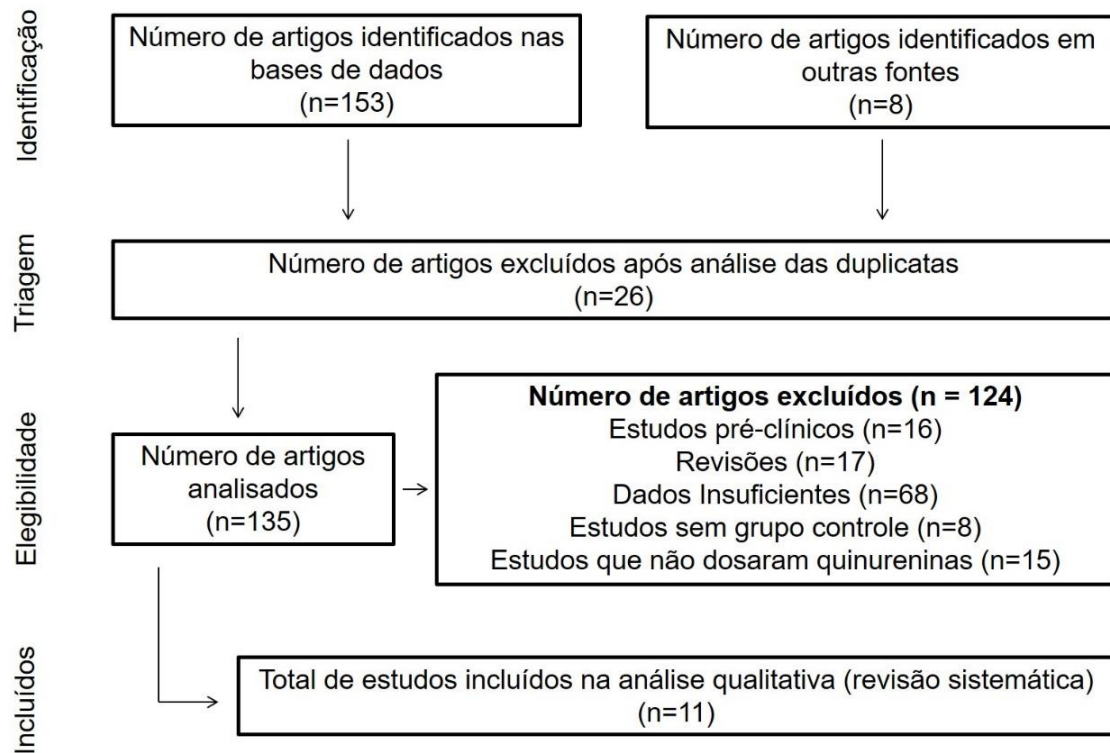
Artigos cujos desfechos primários avaliaram os níveis de quinureninas no período gestacional foram considerados para fornecer as informações necessárias para as análises propostas neste estudo. Como desfechos secundários, estudos que abordassem a relação da gravidez com o perfil inflamatório e a presença das comorbidades mais comuns na gravidez foram considerados para caracterizar e associar a influência da via das quinureninas com o desenvolvimento da gravidez saudável. Em seguida, foi realizada a extração dos dados por dois pesquisadores independentes, conforme formulário padronizado, para compor as tabelas das principais características dos estudos incluídos.

Estudos que apresentaram resultados em valores de mediana e intervalo interquartil foram transformados em média e desvio padrão da média conforme descrito por Hozo, Djulbegovic e Hozo (2005). Não foi aplicado nenhum método estatístico neste estudo. Os valores de comparação para os resultados estatisticamente significativos foram extraídos e discutidos conforme análise realizada pelos autores dos estudos incluídos.

2.1.4 REULTADOS

A estratégia de busca realizada no dia 05 de janeiro de 2021, sem restrição de data de publicação ou idioma, resultou em 153 artigos que, após a aplicação dos critérios de inclusão/exclusão previamente estabelecidos, resultou num total de 11 artigos selecionados para compor esta revisão (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama PRISMA mostrando o método de seleção de elegibilidade dos artigos incluídos no estudo.



Os 11 estudos que obedeceram aos critérios de inclusão estabelecidos nesta revisão foram publicados entre os anos de 2003 e 2019 e classificados como ensaios clínicos observacionais. O conjunto de dados analisados envolveu 3041 grávidas, das quais 195 desenvolveram Pré-eclâmpsia (PE) e em 32 grávidas ocorreu Restrição de Crescimento Fetal (RCF). Um grupo de 70 mulheres interromperam a gestação no primeiro trimestre e serviram de controle para as 46 grávidas que sofreram Aborto Espontâneo Recorrente (AER) também no primeiro trimestre. Estas foram as principais alterações de comprometimento do desenvolvimento normal da gravidez relatadas nos artigos.

Os estudos selecionados abrangeram 6 países, distribuídos principalmente pelos Continentes Asiático, Europeu e Oceania. A descrição e desenho dos estudos estão apresentados nos quadros 1 e 2. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi a metodologia mais utilizada para a dosagem das quinurenina (9 estudos) e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a mais utilizada para avaliar a expressão da IDO (4 estudos). Cromatografia gasosa e imunohistoquímica também foram utilizadas. A placenta foi o principal meio utilizado para análise dos parâmetros bioquímicos.

Durante a pesquisa sistemática, foi observado um grande número de estudos que buscaram esclarecer o papel da via das quinureninas com o desenvolvimento da gravidez e as mais diversas alterações que ocorrem durante o ciclo gravídico, porém, nem todos forneceram dados suficientes para serem incluídos nesta revisão. O foco principal dos estudos incluídos voltou-se para a ação da IDO, cujos dados foram extraídos e tabelados (Tabela 1).

Não houve uma preocupação entre a maioria dos autores em avaliar os demais metabólitos ativos derivados do catabolismo do TRP a partir da IDO. Por isso, não foi possível realizar a metanálise, uma vez que os estudos não apresentaram a robustez necessária pra tal. Porém, os dados referentes a TRP, quinurenina e demais metabólitos foram extraídos, tabelados e analisados conforme discutidos nos artigos (Tabelas 2 e 3).

Todos os autores foram conclusivos em seus principais achados, evidenciando a importância da atividade da IDO no desenvolvimento da tolerância materno-fetal. Os resultados tabelados indicam uma associação negativa da atividade da IDO com o desenvolvimento de PE, AER e RCF. Quanto ao único estudo que dosou os níveis de Ácido Quinurênico (Ac. KYN) na PE, foi demonstrado que neste quadro, as concentrações plasmáticas de Ac. KYN são mais altas na 18ª semana gestacional do que em mães que não desenvolveram PE (NILSEN et al., 2012).

As demais análises realizadas com os metabólitos como Ácido Xanturênico (AX), Ácido Antranílico (AA), Ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA), 3-hidroxiquinurenina (3HKYN) (NILSEN et al., 2012) e Ácido Quinilínico (AQ) (KEATON et al., 2019) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados. Os dados extraídos do estudo realizado por Murthi, Wallace & Walker (2017), apesar de apresentarem diferença estatística significativa, não foram considerados neste estudo pois avaliaram os níveis dos metabólitos em meios diferentes.

Quadro 1 - Descrição sumária dos estudos incluídos para compor a revisão sistemática, evidenciando as principais comorbidades associadas a gestação.

Autor, ano	Não Grávida (n)	Grávida (n)	Grávida + alteração (n)	Descrição dos grupos
Ban, 2013	-	40	AER - 26	As análises foram realizadas na placenta de mulheres que interromperam legalmente a gravidez no primeiro trimestre e de mulheres que sofreram aborto espontâneo (AER) no 1º trimestre da gravidez.
Blaschitz, 2011	-	10 (1º tri) 10 (termo)	-	As análises foram realizadas na placenta de mulheres que interromperam legalmente a gravidez no primeiro trimestre e de gravidez a termo.
Grozdics, 2014	14	20	-	As análises foram realizadas no plasma de mulheres grávidas no 3º trimestre e de não grávidas na fase lútea.
Keaton, 2019	-	18	PE - 18	As análises foram realizadas na placenta após o parto de mulheres grávidas saudáveis e grávidas que desenvolveram pré-eclâmpsia (PE).
Kudo, 2003	9	12	PE - 14	As análises foram realizadas no plasma de mulheres não grávidas, grávidas e G+PE no 1º primeiro trimestre da gestação e na placenta de mulheres grávidas e G+PE após o parto.
Liu, 2010	-	18	PE - 16	As análises foram realizadas na placenta após o parto de mulheres grávidas saudáveis e de mulheres grávidas que desenvolveram PE.
Murthi, 2017	-	25	RCF - 25	As análises foram realizadas no plasma de mulheres grávidas saudáveis e com Restrição de Crescimento Fetal (RCF) no 1º trimestre da gestação e na placenta após o parto.
Nilsen, 2012	-	2820	PE - 116	As análises foram realizadas no plasma de mulheres grávidas e G+PE no 2º trimestre da gestação.
Nishizawa, 2011	-	23	PE - 18	As análises foram realizadas na placenta após o parto de mulheres grávidas saudáveis e grávidas que desenvolveram PE.
Zardoya, 2018	-	Termo: 9 Pré-Termo:11	RCF:7 PE: 13	As análises foram realizadas na placenta de mulheres com gravidez pré-termo e a termo; e de mulheres que desenvolveram PE e com RCF.
Zong, 2016	-	20	AER - 20	As análises foram realizadas na placenta de mulheres que interromperam a gravidez legalmente e de mulheres que sofreram aborto espontâneo recorrente no 1º trimestre da gravidez.

AER: Aborto espontâneo recorrente; PE: Pré-eclâmpsia; RCF: Restrição de crescimento fetal.

Quadro 2 - Desenho dos artigos evidenciando os protocolos utilizados e marcadores investigados.

Autor, Ano	Tipo do estudo	País	Metodologias	Meio	Marcadores
Ban, 2013	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	China	HPLC e PCR	Placenta	Expressão da IDO
Blaschitz, 2011	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Áustria	HPLC	Placenta e plasma	KYN e TRP
Grozdzics, 2014	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Áustria	HPLC	Plasma	KYN, TRP e Ac. KYN
Keaton, 2019	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Japão	HPLC e PCR	Placenta	Expressão da IDO, TRP, KYN e AQ
Kudo, 2003	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Suécia	HPLC	Placenta e plasma	Atividade da IDO, KYN e TRP
Liu, 2010	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	China	PCR	Placenta	Expressão da IDO
Murthi, 2017	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Austrália	HPLC e PCR	Placenta e plasma	Expressão de IDO, KYN, TRP, AX, 3-HAA e AP
Nilsen, 2012	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Noruega	CG	Plasma	KYN, TRP, AA, AX, 3HKYN, Ac. KYN e 3-HAA.
Nishizawa, 2011	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Japão	HPLC	Placenta	Atividade da IDO
Zardoya, 2018	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	Áustria	HPLC	Placenta	Atividade da IDO
Zong, 2016	Ensaio clínico, Observacional, Prospectivo.	China	HPLC, Imunohistoquímica	Placenta	Expressão e atividade da IDO

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; PCR: Reação em cadeia da polimerase; CG: Cromatografia gasosa; IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenase; TRP: Triptofano; KYN: Quinurenina; Ac. KYN: Ácido quinurênico; AQ: Ácido quinolínico; AA: Ácido antranílico; AX: Ácido xanturênico; 3HKYN: 3-hidroxiquinurenina; 3-HAA: Ácido hidroxiantranílico; AP: Ácido picolínico.

Tabela 1 - Expressão e atividade da IDO no plasma e placenta em diferentes estágios da gravidez normal ou com comorbidades associadas.

EXPRESSÃO DA IDO								
Autor, ano	Tamanho amostral	Grávida (1ºTri)	AER (1ºTri)	Gravidez normal (Pós-parto)	PE	RCF		
Ban, 2013	40/26	0,78±0,9 (Placenta)	0,33±0,40* (Placenta)	-	-	-		
Zong, 2016	20/20	1,004 ±0,03 (Placenta)	0,49 ±0,04* (Placenta)	-	-	-		
Keaton, 2019	18/18	-	-	0,34±0,07 (Placenta)	0,21±0,06* (Placenta)	-		
Liu, 2010	18/16	-	-	0,503 ± 0,3 (Placenta)	0,16± 0,03* (Placenta)	-		
Murthi, 2017	25/25	1,08 ± 0,08 (Plasma)	-	-	-	0,65 ± 0,13* (Plasma)		
ATIVIDADE IDO								
Autor, ano	Tamanho amostral	Não Grávida	Grávida (1ºTri)	AER (1ºTri)	Grávida (3º tri)	Gravidez normal (Pós-parto)	PE	CRF
Blaschitz, 2011	10/10	-	0,09 ±0,08 (Placenta)	-	-	0,189 ±0,09* (Placenta)	-	-
Zong, 2016	20/20	-	1,01 ±0,1 (Placenta)	0,63 ±0,06* (Placenta)	-	-	-	-
Grozdic, 2014	14/20	0,033±0,02 (Plasma)	-	-	0,04±0,008* (Plasma)	-	-	-
Kudo, 2003	9/12/14/14	0,022±0,004 (Plasma)	0,034±0,004* (Plasma)	-	-	-	0,024 ± 0,005* (Plasma)	-

Keaton, 2019	18/18	-	-	-	-	1,86 ± 0,8 (Placenta)	0,45 ± 0,1* (Placenta)	-
Nilsen, 2012	1220/116	-	19,1 ± 0,08 (Plasma)	-	-	-	19,1 ± 0,30 (Plasma)	-
Nishizawa, 2011	23/18	-	-	-	-	6,05 ± 2,01 (Placenta)	3,18 ± 1,87* (Placenta)	-
Zardoya, 2018	9/7/13	-	-	-	-	0,081±0,02 (Placenta)	0,029±0,01* (Placenta)	0,016±0,004* (Placenta)

A atividade da IDO foi obtida a partir da razão Quinurenina/Triptofano. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão da média. *, P<0,05 caso vs controle. AER: Aborto espontâneo recorrente; PE: pré-eclâmpsia; RCF: restrição de crescimento fetal.

Tabela 2 - Dosagem dos níveis de Triptofano e Quinurenina no plasma e placenta de mulheres grávidas normais ou com comorbidades associadas.

NÍVEIS DE TRIPTOFANO (µM)								
Autor, ano	Tamanho amostral	Não Grávida	Grávida (1ºTri)	AER (1ºTri)	Grávida (3º tri)	Gravidez normal (Pós-parto)	PE	CRF
Blaschitz, 2011	10/10	-	57,47±31,13 (Placenta)	-	-	7,2±8,14* (Placenta)	-	-
Grozdics, 2014	20/20	54,1±3,12 (Plasma)	-	-	38,6 ± 2,7* (Plasma)	-	-	-
Keaton, 2019	18/18	-	-	-	-	4,86±1,30 (Placenta)	3,85±0,88* (Placenta)	-
Kudo, 2003	9/12/12/14	53,0 ± 9,8 (Plasma)	32,7 ± 4,8* (Plasma)	-	-	32,7 ± 4,8 (Plasma)	42,8 ± 6,9* (Plasma)	-

Murthi, 2017	25/25	-	28,17±7,3 (Plasma)	-	-	-	-	37,77 ± 18,9 (Plasma)
Nilsen, 2012	2820/116	-	59,0 ± 0,17 (Plasma)	-	-	-	59,7 ± 0,88 (Plasma)	

NÍVEIS DE QUINURENINA (µM)

Autor, ano	Tamanho amostral	Não Grávida	Grávida (1ºTri)	AER (1ºTri)	Grávida (3º tri)	Gravidez normal (Pós-parto)	PE	CRF
Blaschitz, 2011	10/10	-	5,3 ±8,4 (Placenta)	-	-	38 ±11,7 (Placenta)	-	-
Grozdic, 2014	20/20	1,84±0,38 (Plasma)	-	-	1,56±0,52* (Plasma)	-	-	-
Keaton, 2019	18/18	-	-	-	-	2,21 (0,74) (Placenta)	2,06 (0,84) (Placenta)	-
Kudo, 2003	9/12/12/14	1,17 ± 0,28 (Plasma)	1,12 ± 0,17 (Plasma)	-	-	-	1,02 ± 0,22 (Plasma)	-
Murthi, 2017	25/25	-	0,61± 0,12 (Plasma)	-	-	-	-	2,75± 0,25* (Plasma)
Nilsen, 2012	2820/116	-	1,11 ± 0,004 (Plasma)	-	-	-	1,13 ± 0,02 (Plasma)	-

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão da média. *, P<0,05 caso vs controle.

AER: Aborto espontâneo recorrente; PE: pré-eclâmpsia; RCF: restrição de crescimento fetal.

Tabela 3 - Níveis dos metabólitos da via das quinureninas a partir do catabolismo do Triptofano no plasma e placenta de mulheres grávidas normais ou com comorbidades associadas.

METABÓLITOS DA VIA DAS QUINNURENINAS															
Autor, ano	Tamanho amostral	Ac. KYN (nM)		3HKYN (nM)		AA (nM)		AX (nM)		3HAA (nM)		AQ (nM)		AP (nM)	
		Cont	Caso	Cont	Caso	Cont	Caso	Cont	Caso	Cont	Caso	Cont	Caso	Cont	Caso
Grozdics, 2014	14/14 NG/G	0,036 ± 0,008	0,0341± 0,007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Keaton, 2019	18/18 G/PE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,530± 0,31	0,482± 0,23	-	-
Murthi, 2017	25/15 G(1º tri)/ G-RCF	0,1 ± 0,05	0,09 ± 0,01	-	-	-	-	0,06 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,27± 0,1	0,4 ± 0,2	-	-	1,21± 0,4	0,78± 0,7
Nilsen, 2012	2820/116 G/PE	20,7 ± 0,13	23,3 ± 0,77*	25,6 ± 0,22	24,3 ± 0,93	9,55 ± 0,08	9,64 ± 0,39	17,8 ± 0,18	19,5 ± 0,96	41,7 ± 0,29	43,4 ± 1,51	-	-	-	-

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão da média. *, P<0,05 caso vs controle.

NG: Não grávida; G: Grávida; PE: pré-eclâmpsia; RCF: restrição de crescimento fetal; Ac. KYN: Ácido quinurênico; 3HKYN: 3-hidroxiquinurenina; AA: Ácido antranílico; AX: Ácido xanturênico; HAA: Ácido hidroxiantranílico; AQ: Ácido quinolínico; AP: Ácido picolínico.

Foi realizada a aplicação do formulário do National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) como controle de qualidade para avaliar a qualidade dos 11 estudos incluídos nesta revisão (Quadro 3). Com a análise da tabela, é possível verificar que os estudos selecionados apresentam confiabilidade, uma vez que atenderam a várias especificações determinadas pelo NHLBI.

As questões apontadas no formulário são referentes a Questão de pesquisa (1); População do estudo (2,3); Grupos recrutados na mesma população e critérios de elegibilidade uniformes (4); Justificativa do tamanho da amostra (5); Exposição avaliada antes da medição do resultado (6); Prazo suficiente para ver um efeito (7); Diferentes níveis de exposição de interesse (8); Medidas de exposição e avaliação (9); Avaliação de exposição repetida (10); Medidas de resultado (11); Cegamento dos avaliadores de resultados (12); Taxa de acompanhamento (13); Análises estatísticas (14).

Quadro 3 - Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na revisão.

Estudo	Tamanho amostral			Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14
	Autor, Ano	NG	G														
Ban 2013	-	40	AER- 26	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Blaschits, 2011	-	20	NP	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Grozdic, 2014	14	20	NP	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Keaton 2019	-	18	PE - 18	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	Sim	Sim
Kudo, 2003	9	12	PE - 14	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Liu, 2010	-	18	PE - 16	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Murthi, 2017	-	25	RCF - 25	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Nilsen, 2012	-	2820	PE - 116	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Nishizawa 2011	-	23	PE - 18	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Zardoya, 2018	-	20	RCF - 7 PE - 13	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Zong, 2016	-	20	RSA - 20	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim

NG: não grávida; G: Grávida; G+alt: Grávida com alterações patológicas; AER: Aborto espontâneo recorrente; PE: pré-eclâmpsia; RCF: restrição de crescimento fetal. NA: não se aplica; NR: não relatado. Retirado de: The National Heart, Lung and Blood Institute. Ferramentas de avaliação da qualidade do estudo. Acessível em: www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools.

2.1.5 DICUSSÃO

Os primeiros estágios da gravidez são caracterizados pelo correto equilíbrio entre inflamação e tolerância imunológica. A resposta inflamatória ocorre devido a presença de aloantígenos de origem paterna expressos pelo embrião, evento que permite as adaptações uterinas (ALBONICI et al., 2020). Em seguida, para garantir uma gravidez saudável, o organismo feminino passa por um estado ativo de tolerância imunológica durante todo o período da gestação (SAMSTEIN et al., 2012).

Essa adaptação imunológica atenua o risco de rejeição fetal, além de promover a remodelação de artérias espiraladas e o processo de placentação (ROBERTSON et al., 2018). Uma falha nesse complexo sistema, seja pelo aumento anormal da tolerância imunológica ou inflamação excessiva, pode implicar em infertilidade idiopática e aborto espontâneo recorrente, bem como complicações na gravidez de início tardio, decorrentes de insuficiência placentária, incluindo pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal (GREEN & ARCK, 2020; ZARDOYA et al., 2018; KUDO et al., 2003).

Há décadas, estudos vêm sendo realizados para um melhor entendimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento da tolerância imunológica materno-fetal. Está bem documentado uma série de mecanismos imunossupressores placentários que atuam na proteção do feto, tais como aumento de células T regulatórias (DU et al., 2014); diminuição da expressão do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) polimórfico (APPS et al., 2009); aumento de quimiocinas imunossupressoras (KSHIRSAGAR et al., 2012), entre outros.

AIDO, enzima com atividade imunossupressora e chave no catabolismo do triptofano e produção de quinureninas (VACCA et al., 2010), apresenta uma importante distribuição em trofoblastos placentários de gestações normais. Iwahashi e colaboradores (2017), demonstraram que a desregulação desta enzima pode levar à disfunção imunológica pela produção de fatores placentários solúveis que resultam em vias angiogênicas desequilibradas ou inflamação excessiva. Tais fatores podem contribuir com a etiologia de eventos sistêmicos maternos como a hipertensão arterial e a proteinúria (BAN et al., 2013).

Acredita-se que alterações na expressão placentária de IDO não seja o único fator responsável pela quebra da tolerância imunológica materno-fetal. Vários estudos relatam uma associação da regulação negativa dessa enzima com importantes complicações no ciclo gravídico (MURTHI, WALLACE & WALKER, 2017). Dessa forma, o presente estudo buscou esclarecer qual a contribuição da via das quinureninas no desenvolvimento dessa tolerância e se a atividade ou níveis diminuídos de IDO e quinureninas estão relacionados com distúrbios na gravidez tais como o aborto espontâneo recorrente, restrição de crescimento fetal e pré-eclâmpsia.

Dois estudos incluídos nesta revisão avaliaram a ativação da via das quinureninas no plasma de mulheres grávidas e não grávidas em diferentes períodos da gestação (primeiro e terceiro trimestre). Kudo e colaboradores (2003) demonstraram um aumento significativo na depleção de TRP em quinureninas, pelo aumento da atividade da IDO (Tabelas 1, 2 e 3) em mulheres grávidas. O mesmo resultado foi encontrado por Grozdics e colaboradores (2014), que ainda demonstraram uma maior prevalência de células T e monócitos que expressam IDO em mulheres grávidas quando comparadas a mulheres não grávidas.

Esses dados suportam a hipótese de um ambiente imunossupressor sistêmico tanto no primeiro quanto no terceiro trimestre da gestação, característico de uma gestação saudável. De acordo com Trowsdale & Betz (2006), a depleção de TRP pela IDO e aumento de metabólitos da via das quinureninas fornece uma supressão da resposta imune mediada por células T, promovendo inibição da proliferação e indução de apoptose de células T ativadas, além de promover o desenvolvimento de células T regulatórias e células dendríticas tolerogênicas (VACCA et al., 2010).

Nesta revisão, seis estudos avaliaram o envolvimento da via das quinureninas em mulheres grávidas que desenvolveram pré-eclâmpsia. Os achados foram semelhantes em todos os estudos e evidenciaram expressão e atividade da IDO placentária reduzida nas mulheres com pré-eclâmpsia em relação as grávidas normotensas (Tabela 1). A pré-eclâmpsia é um distúrbio hipertensivo grave, que afeta cerca de 10% de todas as mulheres grávidas e uma das principais causas de morte materna e morbidade neonatal em todo o mundo (SOSA et al., 2017).

Kudo e colaboradores (2003), Nishizawa e colaboradores (2011) e Keaton e colaboradores (2019) evidenciaram uma correlação inversa entre redução de

expressão e atividade daIDO placentária com a gravidade dos sintomas de pré-eclâmpsia. Esses achados fornecem evidências de que a redução do mecanismo supressor da inflamação, mediado pela IDO placentária, compromete ações sistêmicas materna e pode contribuir com a patogênese da PE, além de um distúrbio placentário no início da gravidez seguido de inflamação generalizada e lesão progressiva do endotélio (STEEGERS et al., 2010).

No estudo realizado por Liu e colaboradores (2010), foi avaliado o perfil inflamatório em grávidas. Além da diminuição da expressão da IDO, os autores identificaram uma redução da expressão de IL-18 e FoxP3 na placenta pré-eclâmpica. O FoxP3 é um fator de transcrição responsável por suprimir processos inflamatórios e estimular atividade das Tregs (SAMSTEIN et al., 2012). Já a IL-18 é uma interleucina pró-inflamatória indutora interferon- γ (CEMGIL et al., 2012), que por sua vez é um potente indutor de IDO (POLYZOS & KETELHUTH, 2015). A redução desses fatores está diretamente associada a uma desregulação da resposta inflamatória intrínseca à gravidez saudável (KUDO et al., 2003), que pode resultar em má adaptação da tolerância materna e no desenvolvimento da PE por redução da ação da IDO e das células Tregs (VACCA et al., 2010).

Entre os estudos que buscaram avaliar a ação da IDO no quadro de PE, Nilsen e colaboradores (2012) foram os únicos que se preocuparam em dosar os metabólitos ativos produzidos pelo catabolismo do TRP via IDO. No entanto, tal dosagem foi realizada no plasma e não na placenta. O estudo envolveu 2936 mulheres grávidas, das quais 116 desenvolveram PE. Neste estudo, os autores encontraram diferença estatística somente para os níveis de Ac. KYN. O aumento nas concentrações deste metabólito no início da gestação teve associação positiva com maior risco de PE, principalmente em mulheres com IMC pré-gestacional aumentado.

Em condições não gravídicas, Ac. KYN está fortemente associado a uma atividade neuroprotetora justificada por sua ação antagonista sobre receptores glutamatérgicos de N-metil D-Aspartato (NMDA) (MYINT & KIM, 2014). Estudos pré-clínicos demonstraram que o bloqueio desses receptores inibe a liberação de insulina das células pancreáticas, reduz a atividade simpática e, conseqüentemente, reduz a pressão arterial (PA) (STONE & DARLINGTON, 2002; BARDGETT, MCCARTHY & STOCKER 2010).

Ac. KYN também atua como agonista endógeno do receptor 35 acoplado a proteína G (GPR35) (WANG et al., 2015). No quadro inflamatório, essa ativação inibe a liberação de TNF- α por macrófagos, o que leva a diminuição da inflamação. Considerando os fatores benéficos mediados pelo Ac. KYN, os autores sugerem que o aumento desse metabólito na grávida com PE pode ser um mecanismo compensatório com a finalidade de neutralizar as principais características patogênicas da PE.

Zardoya e colaboradores (2018) avaliaram o papel biológico da expressão endotelial constitutiva de IDO1 na vasculatura de grávidas saudáveis, com PE e com RCF. Os autores demonstraram que o TRP promove importante ação vasodilatadora independente do endotélio da microcirculação placentária e que essa ação é regulada pelos níveis de IDO. Neste estudo, assim como nos demais já discutidos, os níveis de IDO encontram-se reduzidos na PE e, mais expressivamente, na RCF.

A restrição de crescimento fetal é uma disfunção placentária que impede o feto de alcançar seu potencial de crescimento intra-uterino. Essa disfunção gera um maior risco de mortalidade perinatal e morbidades com comprometimento do desenvolvimento neurológico e cognitivo (MCCOWAN; FIGUERAS & ANDERSON, 2018). Dessa forma, os resultados do estudo de Zardoya e colaboradores (2018) apontam que os níveis alterados de IDO e TRP podem estar relacionados à patogênese da PE e RCF pelo comprometimento da vasculatura, elevando a PA na mãe e reduzindo a oferta nutricional ao feto, já que a vascularização está potencialmente ligada ao crescimento da placenta e do feto (MURTHI, WALLACE & WALKER, 2017).

O aborto espontâneo recorrente é outra complicação bastante comum da gravidez. É classificado assim quando a mulher sofre três ou mais gestações clínicas interrompidas espontaneamente antes de completar 22 semanas de gestação (NORCOG, 2011). Nesta revisão, 2 estudos avaliaram a relação da IDO e via das quinureninas com RCF. Ban e colaboradores (2013) demonstraram que tanto a expressão como a atividade da IDO na placenta e decídua foram significativamente menores em grávidas que sofreram AER. Zong e colaboradores (2016) encontraram resultados semelhantes e, além disso, demonstraram que a fosforilação de STAT3 em pacientes com AER foi menor em comparação com mulheres grávidas normais. Sabe-

se que a via de sinalização STAT3 desempenha um importante papel na regulação do crescimento, proliferação, migração e invasão das células trofoblásticas (BORG et al., 2015). Dessa forma, os autores sugeriram que a diminuição da ação daIDO pode estar associada a complicações relacionadas ao AER por afetar a proliferação do trofoblasto e a migração através dessa via.

Outros fatores associados a alteração na via das quinureninas, e principalmente aIDO, podem estar envolvidos com o AER. Já foi evidenciado que aIDO1 endotelial expressa na placenta saudável e TRP, atuam para manter a vasodilatação. Tal efeito é vital para a vascularização do feto e a falha nesse sistema pode comprometer a sua sobrevivência (ZARDOYA et al., 2018).

Outra hipótese que poderia explicar essa relação, seria a passagem de células T imunocompetentes ou células inflamatórias do feto para o organismo materno por meio da perda da supressão imunológica pela diminuição da expressão e atividade daIDO. A regulação negativa deIDO e, conseqüente, quebra da tolerância imunológica materno-fetal, pode resultar na expulsão do feto pelo organismo materno (NISHIZAWA et al., 2011).

Embora os dados apresentados não tenham sido suficientes para a realização de uma metanálise, foi possível identificar nos estudos que os níveis reduzidos de expressão e atividade daIDO estão diretamente relacionados a complicações que podem afetar tanto o desenvolvimento normal do feto, quanto comprometer a saúde da mãe, podendo levar ambos ao óbito. Os mecanismos pelos quais isso acontece ainda não estão muito claros. Estudos adicionais que investiguem de maneira detalhada o envolvimento da via das quinureninas e não apenas da enzimaIDO poderão contribuir para a identificação de estratégias farmacológicas aplicáveis a doenças associadas à gravidez.

2.1.6 CONCLUSÕES

Demonstramos nesta revisão sistemática da literatura que o catabolismo do triptofano pela enzima IDO desempenha importante papel imunossupressor na interface materno-fetal. Os resultados dos 11 artigos selecionados no presente estudo fornecem dados que suportam a hipótese de uma forte associação da regulação negativa dessa enzima com alterações deletérias ao ciclo gravídico, predispondo a maior risco de aborto espontâneo recorrente, restrição de crescimento fetal e/ou pré-eclâmpsia.

2.1.7 REFERÊNCIAS

- ALBONICI, L. et al. PIGF Immunological Impact during Pregnancy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8714, 2020.
- ALI, S. et al. Cytokine imbalance at materno-embryonic interface as a potential immune mechanism for recurrent pregnancy loss. **International Immunopharmacology**, v. 90, p. 107118, 2021.
- APPS, R. et al. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. **Immunology**, v. 127, n. 1, p. 26-39, 2009.
- BAN, Y. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase levels at the normal and recurrent spontaneous abortion fetal–maternal interface. **Journal of international medical research**, v. 41, n. 4, p. 1135-1149, 2013.
- BARDGETT, M.E.; MCCARTHY, J.J.; STOCKER, S.D. Glutamatergic receptor activation in the rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoexcitatory response to hyperinsulinemia. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 284-290, 2010.
- BELL, E. Reproductive immunology: A bad combination. **Nature Reviews Immunology**. v.4(12), p.927, 2004.
- BLASCHITZ, A. et al. Vascular endothelial expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the fetomaternal interface. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21774, 2011.
- BORG, A.J. et al. Decreased STAT3 in human idiopathic fetal growth restriction contributes to trophoblast dysfunction. **Reproduction**, v. 149, n. 5, p. 523-532, 2015.
- CEMGIL, D.A. et al. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- γ and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 25, n. 9, p. 1569-1573, 2012.
- DU, Mei-Rong et al. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal–fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1502-1511, 2014.
- GREEN, E.S.; ARCK, P.C. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. In: **Seminars in Immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-17, 2020.
- GROZDICS, E. et al. B7 co-stimulation and intracellular indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. **BMC**

pregnancy and childbirth, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

HOZO, S.P.; DJULBEGOVIC, B.; HOZO, I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. **BMC medical research methodology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2005.

HUANG, L.; BABAN, B.; JOHNSONIII, B. A.; MELLOR, A. L. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. **Int. Rev. Immunol.** v. 22 (9), 2013.

IWAHASHI, N. et al. Downregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in the villous stromal endothelial cells of placentas with preeclampsia. **Journal of reproductive immunology**, v. 119, p. 54-60, 2017.

KAZMA, J.M. et al. Anatomical and physiological alterations of pregnancy. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, p. 1-15, 2020.

KEATON, S.A. et al. Altered tryptophan catabolism in placentas from women with preeclampsia. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 12, p. 1178646919840321, 2019.

KING, N.J.C; THOMAS, S.R. Molecules in focus: indoleamine 2, 3-dioxygenase. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2007.

KSHIRSAGAR, S.K. et al. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 982-990, 2012.

KUDO, Y. et al. Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2, 3-dioxygenase in preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 188, n. 3, p. 719-726, 2003.

LI, X. et al. Pregnancy immune tolerance at the maternal-fetal interface. **International Reviews of Immunology**, v. 39, n. 6, p. 247-263, 2020.

LIU, S. et al. The role of decidual immune cells on human pregnancy. **Journal of reproductive immunology**, v. 124, p. 44-53, 2017.

LIU, X. et al. Reduced expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase participates in pathogenesis of preeclampsia via regulatory T cells. **Molecular medicine reports**, v. 4, n. 1, p. 53-58, 2011.

LONGO, L.D. Maternal Physiology of Pregnancy. In: **The Rise of Fetal and Neonatal**

Physiology. Springer, New York, NY, 2018. p. 217-280.

MCCOWAN, Lesley M.; FIGUERAS, Francesc; ANDERSON, Ngaire H. Evidence-based national guidelines for the management of suspected fetal growth restriction: comparison, consensus, and controversy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 218, n. 2, p. S855-S868, 2018.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Med**, v. 21, p. e100097, 2009.

MURTHI, P.; WALLACE, E.M.; WALKER, D.W. Altered placental tryptophan metabolic pathway in human fetal growth restriction. **Placenta**. v.52, p.62-70, 2017.

MYINT, A.M.; KIM, Y.K. Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 304-313, 2014.

NELP, M.T. et al. Immune-modulating enzyme indoleamine 2, 3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apoforn. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 13, p. 3249-3254, 2018.

NILSEN, R.M. et al. Maternal tryptophan and kynurenine pathway metabolites and risk of preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, v. 119, n. 6, p. 1243, 2012.

NISHIZAWA, H. et al. Impact of indoleamine 2,3-dioxygenase on the antioxidant system in the placentas of severely pre-eclamptic patients. **Syst. Biol. Reprod. Med.** v.57, p.174-178, 2011.

NO, RCOG Green-top Guideline. The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage. **RCOG: London, UK**, 2011

PALM, M. et al. Involvement of inflammation in normal pregnancy. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, v. 92, n. 5, p. 601-605, 2013.

POLYZOS, K.A.; KETELHUTH, D.F. The role of the quinurenina pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. **An emerging field. Hamostaseologie.** v.35 (2), p.128-36, 2015.

PORTUGUEZ, R.C. & SUTPHIN, G.L. Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and

healthspan. **Experimental gerontology**, v. 132, p. 110841, 2020.

ROBERTSON, S.A. et al. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 10, p. 4224-4235, 2018.

SAMSTEIN, R.M. et al. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 29-38, 2012.

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovascular journal of Africa**, v. 27, n. 2, p. 89, 2016.

SOSA, E.Y. et al. New insights into the role of matrix metalloproteinases in preeclampsia. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1448, 2017.

STEEGERS, E.A.P. et al. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 631-644, 2010.

TROWSDALE, J.; BETZ, A.G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nature immunology**, v. 7, n. 3, p. 241-246, 2006.

STONE, T.W.; DARLINGTON, L. Gail. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. **Nature reviews Drug discovery**, v. 1, n. 8, p. 609-620, 2002.

VACCA, P. et al. Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11918-11923, 2010.

WANG, Q. et al. Deregulated tryptophan-kynurenine pathway is linked to inflammation, oxidative stress, and immune activation pathway in cardiovascular diseases. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 20, p. 1116, 2015.

XU, L. et al. Crosstalk Between Trophoblasts and Decidual Immune Cells: The Cornerstone of Maternal-Fetal Immunotolerance. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

YANG, F.; ZHENG, Q. & JIN, L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2317, 2019.

ZARDOYA-LAGUARDIA, P. et al. Endothelial indoleamine 2, 3-dioxygenase-1 regulates the placental vascular tone and is deficient in

intrauterine growth restriction and preeclampsia. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

ZONG, S. et al. Dysregulated expression of IDO may cause unexplained recurrent spontaneous abortion through suppression of trophoblast cell proliferation and migration. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

2.2 Artigo 2 – Efeitos da Ativação da Via das Quinureninas no Desenvolvimento do Diabetes mellitus: Dados de uma Metanálise

2.2.1 RESUMO

A via das quinureninas é uma complexa via metabólica envolvida na fisiopatologia de vários sistemas. É originada a partir do catabolismo do Triptofano (TRP) pelas enzimas Triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e, em condições inflamatórias, pela Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). O aumento da atividade da IDO é um fator preditor de doenças inflamatórias como obesidade e diabetes. O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma condição que necessita de tratamento constante e seu portador apresenta risco de desenvolver complicações que podem levar a óbito. Dessa forma, quanto maior a elucidação dos fatores envolvidos no DM2, maior será a garantia de prover terapias mais direcionadas à doença. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar resultados já publicados na literatura para determinar o perfil de ativação da via das quinureninas e sua relação com o desenvolvimento e complicações associadas ao DM2. Para isso, foi realizado um protocolo de elaboração de revisões sistemáticas e metanálises. Dois pesquisadores calibrados realizaram uma busca sistemática da literatura de artigos publicados e enquadrados em critérios pré-definidos. Após a triagem, 12 estudos se adequaram à proposta e compuseram a presente revisão. Nos estudos selecionados, foram dosados vários metabólitos ativos oriundos do catabolismo do TRP pela IDO em pacientes diabéticos e voluntários saudáveis. Os dados metanalíticos foram obtidos pela aplicação da diferença de média padronizada, utilizando o programa estatístico Manager 5. Os resultados obtidos indicaram maior depleção do TRP no quadro diabético -2,38 (IC 95%: -3,55; -1,21), o que culminou no aumento nos níveis de quinurenina 0,50 (IC 95%: 0,27; 0,72). O quadro diabético deslocou o catabolismo da quinurenina para uma maior síntese de dois novos metabólitos, o ácido quinurênico 0,37 (IC 95%: 0,16; 0,59) e o 3-hidroxiquinurenina 0,04 (IC 95%: 0,03; 0,06), mas pareceu não alterar os níveis de ácido antranílico e do ácido 3-hidroxi-antranílico. Nem todos os metabólitos da via foram dosados nos estudos, o que gerou um viés na análise completa da via. No entanto, evidenciamos aumento significativo de importantes metabólitos que apresentam diferentes ações fisiológicas e que estão mais ativos no diabetes. Futuros estudos são requeridos para validação dos nossos achados.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 2; Triptofano; Indoleamina 2,3-dioxigenase.

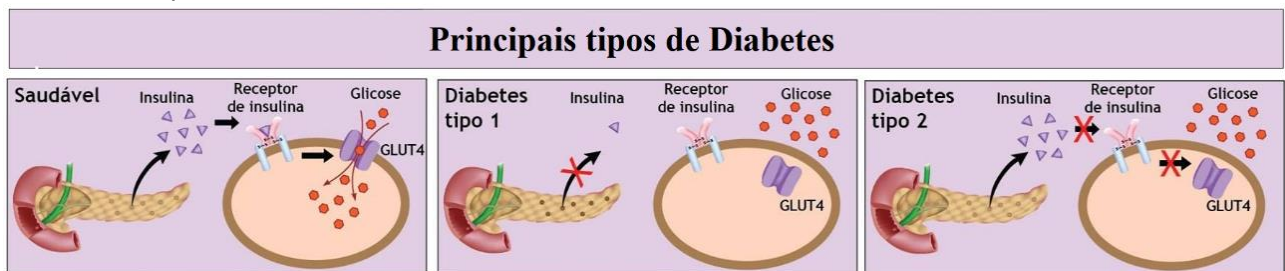
2.2.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por um quadro hiperglicêmico, resultante da não secreção ou redução da secreção do hormônio insulina pelo pâncreas (Figura 4). Em ambos os casos, a glicose é impedida de ser captada pelas células, ocorrendo um acúmulo de glicose no sangue (PAPATHEODOROU et al., 2018). A hiperglicemia crônica do diabetes está associada

a danos que acarretam disfunção e insuficiência de diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2018).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA), o DM é classificado em quatro categorias: 1) Diabetes tipo 1, caracterizado pela destruição das células beta-pancreáticas (auto-imune e idiopático); 2) Diabetes tipo 2, caracterizado por diminuição de secreção e resistência à insulina; 3) Outros tipos específicos, categoria que abrange as mais variadas etiologias como defeitos genéticos, endocrinopatias, drogas ou produtos químicos, infecções e formas incomuns de diabetes imunomediado; e 4) Diabetes Gestacional, com hiperglicemia diagnosticada pela primeira vez no segundo ou terceiro trimestre da gravidez (ADA, 2014).

Figura 4 - Figura esquemática dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do Diabetes tipo 1 e Diabetes tipo 2.



(Adaptado de <https://br.pinterest.com/clemlab>).

O DM1 pode acometer indivíduos em qualquer faixa etária, porém geralmente é comum iniciar antes dos 30 anos de idade (GROSS et al., 2002). Esse tipo de DM é subdividido em DM1-Imunomediado e DM1-Idiopático e seu tratamento exige o uso de insulina por toda a vida. No DM-Imunomediado, ocorrem vários estágios que culminam na morte das células beta-pancreáticas, as quais são reconhecidas pelo sistema imune como antígenos, e por consequência disso, sofrem apoptose. No DM-Idiopático, a destruição das células beta-pancreáticas não tem causa conhecida (ADA, 2002).

O DM2 é caracterizado pela resistência insulínica no fígado e tecidos periféricos que, em conjunto, promovem a hiperinsulinemia, disfunção das células beta pancreáticas, intolerância à glicose e finalmente o estado diabético hiperglicêmico (WANG, 2014). A resistência insulínica hepática provoca aumento da síntese de

triglicérides, diminuição do glicogênio e aumento da gliconeogênese no fígado (ORMAZABAL et al., 2018)

Entre os fatores envolvidos no desenvolvimento do DM2 destacam-se os antecedentes familiares, consumo de dietas hipercalóricas, sobrepeso, sedentarismo e faixa etária da população (HOSSAIN, KAWAR & NAHAS, 2007; MEDEIROS et al, 2012). O quadro crônico de DM2 é um fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e disfunção endotelial (CHIA, EGAN & FERRUCCI, 2018), tornando o portador de DM2 mais propenso à mortalidade por doença cardíaca, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral (HAFFNER, 2000; MEDEIROS et al., 2012).

O DM2 é uma condição que necessita ser tratada para o resto da vida e sua frequência está aumentando em todo o mundo. A projeção da “Internacional Diabetes Federation” (IDF, 2012) para 2030 é de 552 milhões de indivíduos com DM, o que corresponderá a 9,9% da população mundial adulta. A estimativa para o Brasil, no mesmo período, é de 11,3 milhões de pessoas com diabetes, colocando o país em oitavo lugar no mundo com o maior número de pessoas com a doença (WHO, 2016; OLIVEIRA et al., 2018).

Em estudo realizado pelo Comitê de Especialistas em Diagnóstico e Classificação de Diabetes Mellitus, os critérios diagnósticos para determinar o DM2 estão relacionados a associação entre os níveis de glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, intolerância à glicose e a presença de retinopatia como o principal fator para identificar o nível de glicose limiar. Indivíduos com glicemia de jejum alterada e/ou intolerância são referidos como pré-diabéticos, o que indica risco relativamente alto para o desenvolvimento futuro de diabetes (GENUTH et al., 2003, ADA 2018).

O DMG é caracterizado por hiperglicemia que ocorre durante a gravidez e atinge valores que, apesar de maiores que o normal, são inferiores aos estabelecidos para o diagnóstico de diabetes tipo 2. Apesar dos diversos avanços já alcançados e relacionados ao diagnóstico e tratamento das doenças típicas da gestação, o DMG ainda é responsável por grande número de mortes maternas e fetais, bem como de diversas outras consequências não letais (ADA, 2014). O quadro de hiperglicemia pode ser transitório ou persistir após o parto, caracterizando-se como importante fator

de risco independente para desenvolvimento futuro de DM2. A prevalência varia de 1 a 14% a depender da população estudada e do critério diagnóstico adotado (OMS, 2013; ADA, 2014). Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos descritos para o diabetes tipo 2, incluindo, ainda, idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, além de antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, entre outros (Organização Pan-Americana de Saúde, 2016).

Estudos têm sugerido o envolvimento da via da quinurenina na disfunção endotelial, característica em DM, como uma resposta antagônica à cascata inflamatória (BERTOLUCI, 2008). Estudo realizado por Polyzos e colaboradores (2015), revelaram em ensaios pré-clínicos que a inibição da IDO por 1-MT (1-metil-triptofano) desencadeou aumento da inflamação arterial e aterosclerose. Entretanto, foi possível verificar que o Ácido Antranílico (AA), metabólito produzido na via das quinureninas, conseguiu reverter os efeitos deletérios da inibição da IDO sobre a expressão de Molécula de Adesão Celular-Vascular (VCAM).

Mangge e colaboradores (2014) demonstraram que pacientes com obesidade, um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 e DMG, apresentam maior expressão da IDO e consequente degradação do triptofano por essa enzima. Tais dados sugerem que IDO poderia atuar como fator supressor da inflamação local a fim de restabelecer a homeostasia desregulada pelo quadro hiperglicêmico.

Embora relatos da literatura demonstrem o envolvimento dos metabólitos da via das quinureninas em quadros de DM, não há estudos que reúnam dados com uma avaliação agrupada desses achados. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar o perfil de ativação da via das quinureninas no DM2 como resposta compensatória voltada para a diminuição das ações deletérias causadas pela hiperglicemia. Portanto, realizamos uma metanálise a partir de uma avaliação quantitativa dos metabólitos resultantes da via e exploramos sua ligação com essas ações regulatórias.

2.2.3 METODOLOGIA

Para a realização deste estudo, os autores seguiram o protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis), o qual delinea as etapas para o desenvolvimento de uma revisão sistemática e meta-análise (MOHER et al., 2009).

Critérios de inclusão

Os estudos foram selecionados conforme enquadramento nos seguintes critérios: (I) Estudos clínicos (II) Diagnóstico de Diabetes tipo 2 (III) Diagnóstico de disfunção vascular (IV) Determinação, por meio de parâmetros laboratoriais, dos níveis de quinureninas (V) Comparação dos níveis de quinureninas de pacientes diabéticos com voluntários saudáveis.

Busca sistemática

A busca sistemática foi realizada por dois investigadores calibrados nas bases de dados MEDLINE (National Library of Medicine), SCIENCE DIRECT e GOOGLE SCHOLAR, usando a combinação dos seguintes descritores: “*Type 2 Diabetes mellitus*”, “*Endothelial dysfunction*” e “*Kynurenine pathway*”. A busca ocorreu para artigos publicados anteriormente a 20 de junho de 2019. Não houve restrição de linguagem na busca sistemática e as referências dos estudos foram analisadas para identificação de possíveis estudos adicionais.

Extração dos dados

Foram considerados os artigos cujos desfechos primários avaliassem os níveis de quinureninas em pacientes diabéticos para fornecer as informações necessárias para a análise propostas neste estudo. Como desfechos secundários, foram consideradas metodologias que dosaram os níveis de citocinas pró-inflamatórias e presença de outras comorbidades relacionadas ao avanço do quadro diabético para caracterizar e fundamentar a relação dos metabólitos oriundos da via das

quinureninas com o quadro diabético. Para isso, dois investigadores independentes realizaram a extração dos dados, seguindo formulário padronizado, para compor as tabelas das principais características dos estudos incluídos.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software Review Manager versão 5.3.5 (RevMan, Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014).

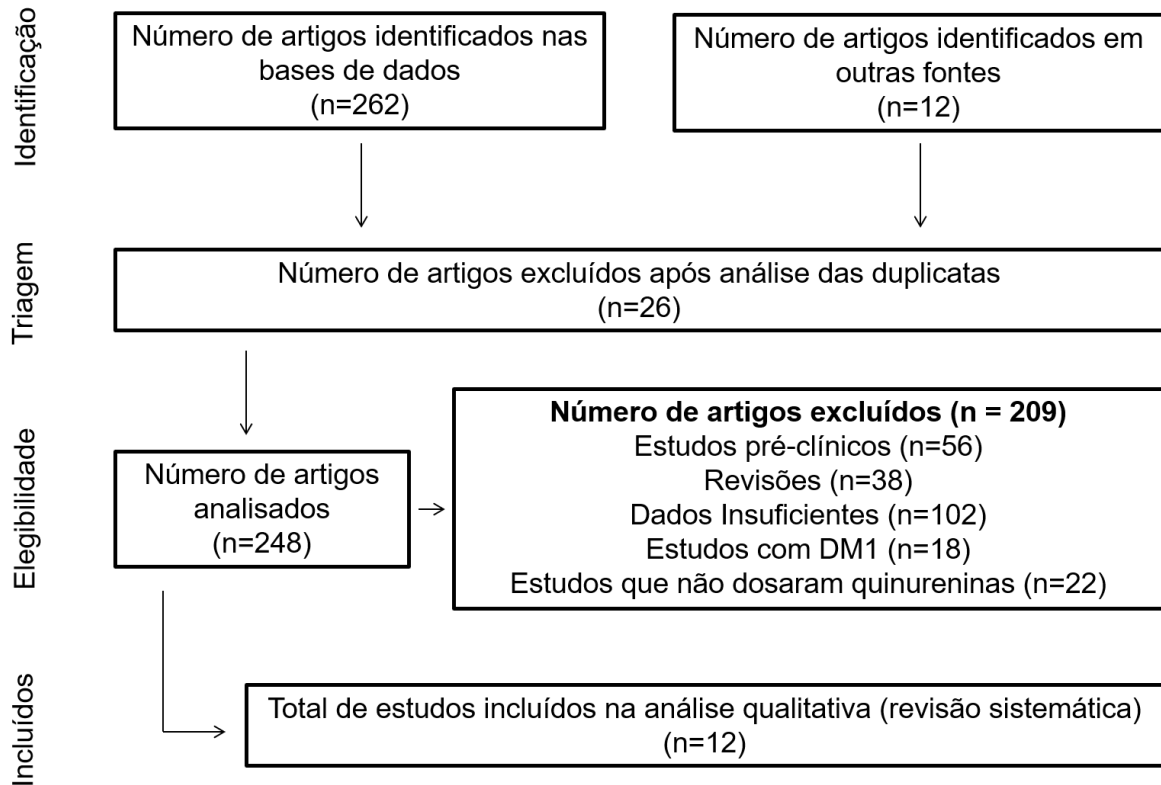
O teste estatístico qui-quadrado baseado em Q (I^2) foi usado para avaliar a presença de heterogeneidade com avaliação do funnel plot para heterogeneidade. Quando o valor de I^2 não foi estatisticamente significativo ($I^2 < 50\%$, $P > 0,05$), o modelo de efeito fixo foi usado para estimar a diferença da Média Combinada (MC). Por outro lado, quando a heterogeneidade foi significativa ($I^2 > 50\%$, $P < 0,05$), o modelo de efeitos aleatórios foi usado para o cálculo de MC.

Em ambos os métodos, o valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os dados extraídos dos estudos foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) para comparar os níveis de quinureninas nos grupos avaliados. Quando o estudo trouxe resultados em valores de mediana e intervalo interquartil, a média e EPM desses dados foram estimados conforme descrito por Hozo, Djulbegovic e Hozo (2005).

2.2.4 REULTADOS

A estratégia de busca foi realizada em 19 de junho de 2020, sem restrição de data de publicação ou idioma e resultou em 262 artigos que, após a aplicação dos critérios de inclusão/exclusão previamente estabelecidos, foram selecionados um total de 12 artigos para compor esta revisão (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama PRISMA mostrando o método de seleção de elegibilidade dos artigos incluídos no estudo.



Os 12 estudos incluídos que obedeceram aos critérios de inclusão estabelecidos e foram publicados entre os anos de 2015 e 2019. Todos os estudos foram do tipo observacionais. O conjunto de dados analisados envolveram 2208 pacientes provenientes de 9 países e as informações sociodemográficas, bem como o perfil de cada estudo estão apresentados nas tabelas 4 e quadro 4.

As principais comorbidades associadas ao quando diabético relatadas nos estudos foram hipertensão com 3 estudos e angina pectoris com 2 estudos. Outras doenças relatadas foram infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, retinopatia diabética, doenças coronarianas e nefropatia diabética. A cromatografia líquida de alta eficiência foi a metodologia mais utilizada (8 estudos) para dosar no plasma ou soro os metabólitos da via das quinureninas, cromatografia gasosa e ELISA também foram utilizadas (Quadro 4).

Após a compilação dos dados, observou-se que nos últimos 5 anos houve um grande interesse voltado para a possível relação existente entre o quadro diabético e a ativação da via das quinureninas, assim como as possíveis implicações decorrentes

dessa relação. A partir da literatura selecionada, os dados referentes a dosagem de metabólitos da via das quinureninas foram extraídos e tabelados (Tabela 5).

Todos os autores foram conclusivos em seus principais achados, indicando uma associação positiva do quadro diabético com o aumento na ativação da via das quinureninas (Quadro 5). Estudos realizados por Munipally e colaboradores (2011), Pedersen e colaboradores (2015), e Zhang e colaboradores (2016), que avaliaram as quinureninas em um grupo separado de diabéticos com retinopatia diabética, risco de infarto agudo do miocárdio e nefropatia diabética, respectivamente, demonstraram que quanto mais grave o quadro diabético, maiores são os níveis de quinureninas observados.

Tabela 4 - Dados sociodemográficos extraídos dos artigos incluídos na metanálise.

Publicação	Tamanho amostral (n)		Idade (média)		N° Homem/Mulher		Glicemia de jejum (mg/dL)		Comorbidades
	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	
Ahmadou, 2015	63	63 c/DCV 63 s/DCV	46,24 ± 8,7	52,56 ± 6,24 57,3 ± 7,99	33 / 30	33/30 DCV 37/26 s/DCV	82,54 ± 9,65	210,14 ± 68,4 210,1 ± 57,17	DCV: Infarto do Miocárdio, Angina, Insuficiência Cardíaca, Isquemia
Hussain, 2017	28	6 c/DCV 55 s/DCV	33	58	14/14	25/36	-	-	DCV: Hipertensão, Complicações Cardíacas
Mallmann, 2018	106	55	29 ± 8,7	36 ± 6,1	47/59	28/27	85 ± 9,1	114 ± 8,7	Não reportado
Matsuoka, 2017	20	20	61±8,8	65±6,10	-	-	92,5±16,4	-	Não reportado
Mudry, 2016	12	12	59±2	58±2	12	12/0	-	-	Não reportado
Munipally, 2011	35	24 c/RD 22 s/RD	-	-	-	-	-	-	*RD: retinopatia diabética
Oxenkrug, 2015	24	30	43,3 ± 10,9	53,8 ± 8,3	12/12	12/18	-	157±22,4	Não reportado
Pedersen, 2015	1408	1603	61	62	-	-	97,3	111	Hipertensão; Angina
Rebnord, 2017	2346	173	61,4	62,3	1714 /632	127/46	97,5	113,6	Hipertensão; doença coronariana
Takada, 2019	83	30	64,9 ± 8,5	67 ± 9,6	44/39	30/0	97,1 ± 10,3	-	Não foi reportado
Takada, 2018	20	20	61,5 ± 9,6	65,7 ± 10,4	20/0	20/0	-	-	Não foi reportado
Zhang, 2016	24	32 c/ND	39	48	8/16	10/22	-	-	ND: Nefropatia Diabética

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão da média.

Quadro 4 - Desenho dos artigos evidenciando os protocolos utilizados e marcadores investigados.

Autor, ano	Tipo do estudo	País	Metodologias	Meio	Investigação dos Marcadores
Ahmadou, 2015	Observacional, longitudinal, prospectivo, coorte	Síria	ELISA	Soro	Proteínas séricas
Hussain, 2017	Observacional, longitudinal, prospectivo, coorte	Pakistão	Ensaio colorimétrico	Soro	Quinurenina e Triptofano (atividade IDO)
Mallmann, 2018	Observacional, transversal, prospectivo	Brasil	HPLC ELISA	Soro Plasma	Quinurenina e Triptofano (atividade IDO) Proteína C-reat., Linfócitos, leucócitos
Matsuoka, 2017	Observacional, longitudinal, prospectivo	Japão	HPLC	Plasma	Triptofano, L-5-hidroxitriptofano, ácido 5-Hidroxitriptofano, ácido quinurênico, 3-Hydroxyquinurenina, ácido 3-Hidroxitriptofano
Mudry, 2016	Observacional, longitudinal, prospectivo	Suécia	HPLC	Plasma	Triptofano, quinurenina e Ácido quinurênico
Munipally, 2011	Observacional, longitudinal, prospectivo	Índia	HPLC	Soro	Triptofano, quinurenina e Ácido quinurênico, 3hidroxyquinurenina
Oxenkrug, 2015	Observacional, longitudinal,	EUA	CG/MS	Plasma	Triptofano, quinurenina, Ácido quinurênico, Ácido xanturênico e Ácido 3-Hidroxitriptofano
Pedersen, 2015	Observacional, longitudinal,	Noruega	HPLC/MS	Soro	Triptofano, quinurenina, Ácido quinurênico, Ácido xanturênico, Ácido antranílico e Ácido 3-Hidroxitriptofano
Rebnord, 2017	Observacional, longitudinal, prospectivo	Noruega	CG/MS	Soro	Quinurenina e Triptofano (atividade IDO)
Takada, 2019	Observacional, longitudinal	Japão	HPLC	Plasma	Triptofano, quinurenina, Ácido quinurênico, Ácido xanturênico, Ácido antranílico e Ácido 3-Hidroxitriptofano
Takada, 2018	Observacional, longitudinal	Japão	HPLC	Plasma	Triptofano, quinurenina, Ácido quinurênico, Ácido xanturênico, Ácido antranílico e Ácido 3-Hidroxitriptofano
Zhang, 2016	Observacional, longitudinal, prospectivo	China	HPLC	Soro	Quinurenina e Triptofano (atividade IDO)

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay. HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; CG: Cromatografia gasosa; MS: Espectro de massa; IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenase.

Tabela 5 - Níveis de Triptofano e metabólitos da via das quinureninas em pacientes diabéticos do tipo 2.

Autor, Ano	TRP (μM)		KYN (μM)		Ac. KYN (nM)		3HKYN (nM)		3HAA (nM)		AA (nM)		AX (nM)	
	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético	Controle	Diabético
Ahmadou, 2015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hussain, 2017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mallmann, 2018	74,45 \pm 13,58	78,26 \pm 14,13	2,98 \pm 0,69	3,61 \pm 0,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Matsuoka, 2017	59 \pm 9,2	53,4 \pm 13,1	-	-	64,03 \pm 21,65	94,80 \pm 34,86	2,60 \pm 2,246	4,679 \pm 2,35	8,66 \pm 9,73	20,24 \pm 13,99	-	-	-	-
Mudry, 2016	79,86 \pm 2,89	72,91 \pm 2,94	2,31 \pm 0,12	2,29 \pm 0,06	49,79 \pm 4,09	49,79 \pm 4,09	-	-	-	-	-	-	-	-
Munipally, 2011	38,45 \pm 0,95	37,19 \pm 0,51	2,10 \pm 0,07	3,41 \pm 0,16	0,12 \pm 0,003	0,27 \pm 0,18	0,105 \pm 0,002	0,139 \pm 0,003	-	-	-	-	-	-
Oxenkrug, 2015	68,9 \pm 12,21	80,37 \pm 22,5	1,76 \pm 0,48	2,32 \pm 0,84	36,41 \pm 14,37	46,09 \pm 13,31	-	-	23,72 \pm 8,82	16,59 \pm 4,34	-	-	11,46 \pm 5,40	15,25 \pm 5,07
Pedersen, 2015	47,38 \pm 5,16	46,7 \pm 5,88	1,12 \pm 0,17	1,14 \pm 0,19	32,45 \pm 7,14	33,5 \pm 7,75	19,83 \pm 4,16	21,93 \pm 5,2	23,46 \pm 5,43	23,36 \pm 6,02	9,5 \pm 1,99	10,16 \pm 2,14	9,65 \pm 2,81	10,1 \pm 2,89
Rebnord, 2017	46,78 \pm 5,16	48,3 \pm 5,88	1,11 \pm 0,17	1,18 \pm 0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Takada, 2019	68,89 \pm 13,22	64,79 \pm 15,49	1,7 \pm 1,1	1,62 \pm 0,52	64,03 \pm 21,65	94,8 \pm 31,86	2,6 \pm 2,24	4,68 \pm 2,35	10,34 \pm 8,23	20,24 \pm 13,99	16,04 \pm 12,05	21,7 \pm 8	12,37 \pm 5,29	14,87 \pm 5,22
Takada, 2018	140,7 \pm 2,72	132,3 \pm 3,16	0,35 \pm 0,22	0,33 \pm 0,11	1,21 \pm 0,41	1,79 \pm 0,66	0,058 \pm 0,050	0,105 \pm 0,053	0,133 \pm 0,149	0,310 \pm 0,214	0,220 \pm 0,165	0,298 \pm 0,11	0,254 \pm 0,109	0,305 \pm 0,107
Zhang, 2016	47,21 \pm 10,41	42,79 \pm 4,5	1,39 \pm 0,55	2,28 \pm 0,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

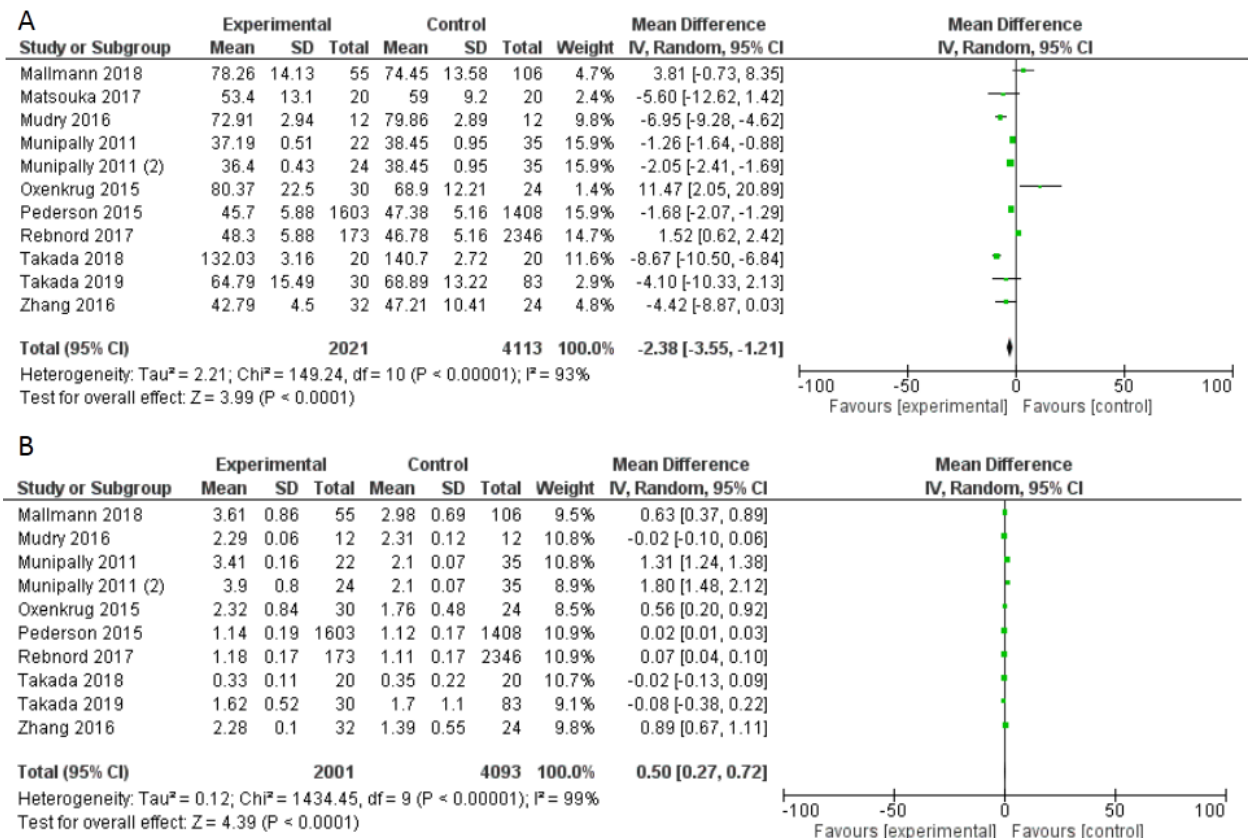
Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. *, P<0,05 diabético vs controle.

Quadro 5 - Principais resultados encontrados nos artigos, demonstrando o envolvimento da via das quinureninas no quadro diabético.

Autor, ano	Tamanho amostral		PRINCIPAIS ACHADOS
	Controle	Paciente	
Ahmadou, 2015	63	63 c/DCV 63 s/DCV	O nível de KMSP é mais alto em pacientes diabéticos e principalmente na presença de DCV. A presença de KMSP foi significativamente maior no grupo diabético DCV do que nos grupos controle e diabético. A presença de KMSP foi significativamente maior no grupo diabético que no grupo controle.
Hussain, 2017	28	6 c/DCV 55 s/DCV	O artigo apresenta dados referentes a razão KYN/TRP (Atividade IDO). A atividade da IDO foi significativamente maior em pacientes diabéticos.
Mallmann, 2018	106	55	O catabolismo do TRP encontra-se alterado em pacientes diabéticos tipo 2. Evidenciado por uma maior atividade da IDO nestes pacientes.
Matsuoka, 2017	20	20	O triptofano foi metabolizado mais em pacientes com DM2 do que em indivíduos não diabéticos evidenciado pela diminuição de TRP e aumento dos metabólitos.
Mudry, 2016	12	12	A concentração de triptofano e quinurenina foi correlacionada positivamente com o IMC, sugerindo uma relação entre esses compostos e obesidade. Porém não houve diferença estatística nas concentrações dos metabólitos em voluntários e pacientes.
Munipally, 2011	35	24 c/RD 22 s/RD	Houve um aumento significativo na expressão da IDO e aumento nos metabólitos da via das quinureninas nas amostras de soro de pacientes diabéticos e ainda maior em pacientes com retinopatia diabética.
Oxenkrug, 2015	24	30	Os achados sustentam a hipótese do trabalho: relação da quinurenina e resistência à insulina e sua progressão para o DM2. Dessa forma, os metabólitos dessa via podem ser os próximos novos biomarcadores de DM2 e novos alvos de prevenção e tratamento do DM2.
Pedersen, 2015	1408	1603	Os níveis elevados de quinureninas plasmáticas se correlacionaram com o aumento do risco de infarto agudo do miocárdio. Com maior risco em pacientes apresentavam desregulação no metabolismo da glicose.
Rebnord, 2017	2346	173	A atividade da IDO, quando medida no soro não teve correlação com pacientes diabético, no entanto, quando medido na urina é um forte preditor de diabetes tipo 2. Dados de urina não plotados.
Takada, 2019	83	30	Os resultados sustentam a ideia de que há um aumento das atividades imunológicas e de estresse no diabetes, que leva ao desequilíbrio de metabólitos que apresentam ação antagônicas (Ac. Quinolínico x Quinurênico). Os níveis plasmáticos de Ac. Quinurênico foram aumentados em pacientes com DM2. Portanto, é possível que o equilíbrio de agonista e antagonista esteja desregulado no diabetes.
Takada, 2018	20	20	Os níveis plasmáticos de metabólitos do triptofano nas vias das quinurenina aumentaram em pacientes com DM2 e pode ser um preditor do DM2.
Zhang, 2016	24	32	Dados de pacientes diabéticos com retinopatia diabética. A atividade do IDO aumentou com a gravidade da doença renal crônica, principalmente em pacientes diabético. Pode se correlacionar estreitamente com a patogênese do DN tipo 2.

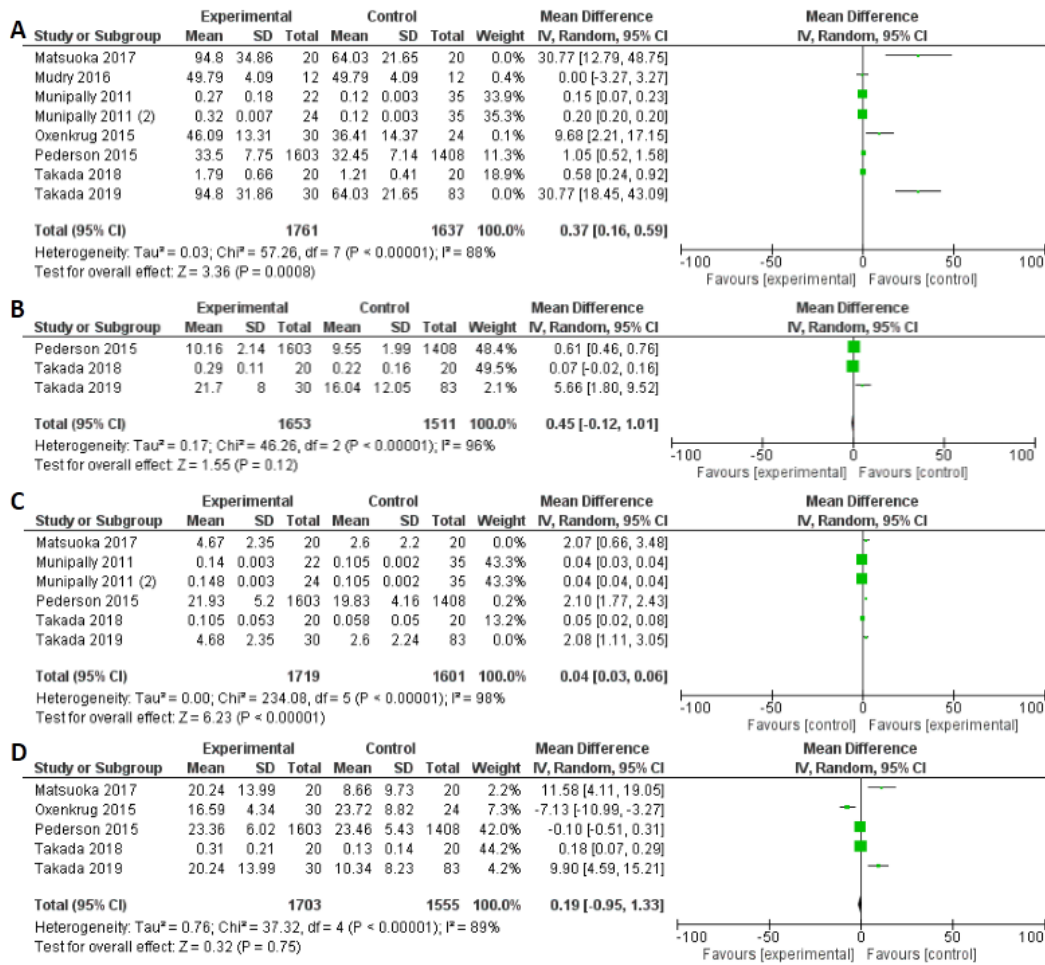
A metanálise realizada pela aplicação do método estatístico que avalia a diferença das médias padronizadas, evidenciou de forma significativa uma redução dos níveis de Triptofano -2,38 (IC 95%: -3,55; -1,21) e aumento de Quinurenina 0,50 (IC 95%: 0,27; 0,72) no soro de pacientes diabéticos (Figura 6). Quanto aos metabólitos oriundos da via analisados, as diferenças estatísticas encontradas evidenciaram aumento nos níveis de Ácido quinurênico 0,37 (IC 95%: 0,16; 0,59) e nos níveis de 3-hidroxiquinurenina 0,04 (IC 95%: 0,03, 0,06) no soro de pacientes diabéticos. Não houve diferença estatística nos níveis de Ácido antranílico e Ácido 3-hidroxi-antranílico, outros metabólitos analisados (Figura 7).

Figura 6 - Meta-análise da diferença de média padronizada dos de TRP (A) e Quinurenina (B).



Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. *, P<0,05 caso vs controle.

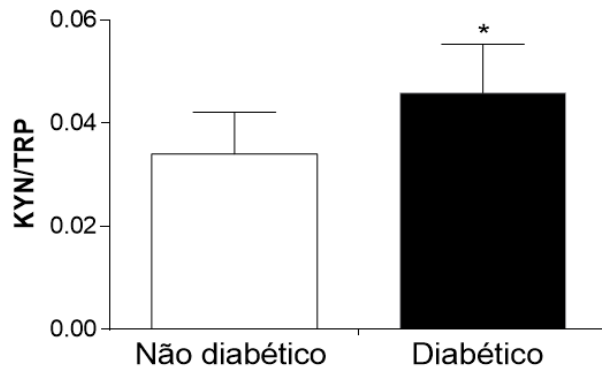
Figura 7 - Meta-análise da diferença de média padronizada dos de Ácido quinurênico (A), Ácidoantranílico (B), 3-hidroxiquinurenina (C), Ácido 3-hidroxi-antranílico (D).



Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. *, P<0,05 caso vs controle.

Como a maioria dos artigos incluídos neste estudo dosaram os níveis de TRP e KYN, foi possível analisar a atividade da IDO, enzima que dá início à ativação da via das quinureninas, através da razão KYN/TRP. Como é possível observar na Figura 8, houve um aumento significativo da atividade da atividade da IDO em pacientes diabéticos, indicando uma maior ativação dessa via nesta condição.

Figura 8 - Atividade da Ido obtida a partir da razão Quinurenina/Triptofano.



Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. *, $P < 0,05$ Diabético vs Não Diabético. Abreviações: KYN (quinurenina); TRP (triptofano)

Foi realizada a aplicação do NHLBI como controle de qualidade para avaliar a qualidade dos 12 estudos incluídos nesta revisão (Quadro 6). Com a análise da tabela, é possível verificar que os estudos selecionados apresentam confiabilidade, uma vez que atenderam a várias especificações determinadas pelo NHLBI.

Quadro 6 - Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na revisão.

Publicação	Sample size (n)		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14
	Author, Year	Control														
Ahmadou, 2015	63	63 (DC) 63	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Hussain, 2017	28	6 (DC) 55	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Mallmann, 2018	106	55	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NA	Sim	Sim	Sim	NA	NR	Sim
Matsuoka, 2017	20	20	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Mudry, 2016	12	12	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Munipally, 2011	35	25 (RD) 63	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Oxenkrug, 2015	24	30	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Pedersen, 2015	1408	1603	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Rebnord, 2017	2346	173	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Takada, 2019	83	30	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Takada, 2018	20	20	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim
Zhang, 2016	24	32 (ND)	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NA	Sim	NR	Sim	NA	NR	Sim

DM2: Diabetes tipo 2; DCV: Doenças cardiovasculares; RD: Retinopatia diabética; ND: Nefropatia diabética; NA: Não se aplica; NR: Não repostado.

Retirado de: The National Heart, Lung and Blood Institute. Ferramentas de avaliação da qualidade do estudo. Acessível em: www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools.

2.2.5 DICUSSÃO

Até o presente momento, este é o primeiro estudo de metanálise que buscou relacionar o perfil de ativação da via das quinureninas com o desenvolvimento e agravamento do quadro diabético em pacientes com DM2.

Mecanismos relacionados ao desenvolvimento e complicações do diabetes são múltiplos e não completamente compreendidos (DONATH, 2014). O envolvimento cardiovascular apresenta-se como a complicação mais perigosa em pacientes diabéticos e seu controle continua a ser um desafio aos pesquisadores da área. Nos últimos anos, vários estudos buscam evidências que estabeleçam uma relação entre as alterações metabólicas causada pelo quadro diabético com o processo de ativação da via das quinureninas (MÁNDI & VÉCSEI, 2012).

Acredita-se que a via das quinureninas, ao produzir seus metabólitos biologicamente ativos, promova ação de autorregulação em resposta a um quadro inflamatório e esteja envolvida no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, autoimunes e infecciosas, distúrbios neurológicos e afetivos, e na malignidade do câncer, porém pouco se conhece sobre o real papel desenvolvido por essa via (CHEN & GUILLEMIN, 2009; CERNARO, 2020). Dessa forma, este estudo visou coletar dados confiáveis que apoiem essa teoria, focando no estado diabético e suas complicações.

Os dados deste estudo foram extraídos de um diverso grupo composto por homens e mulheres, adultos e idosos que apresentavam ou não comorbidades associadas ao diabetes. Ainda que os estudos tenham sido realizados em países com etnia, cultura e costumes diferentes, como foi descrito na tabela 1 e quadro 1, o presente estudo evidenciou correlações existentes entre a ativação da via das quinureninas e o quadro diabético. Mostrou ainda que quanto mais grave o quadro diabético, devido a alguma comorbidade, mais expressiva é a ativação dessa via.

Foi evidenciado neste estudo um aumento significativo na depleção de triptofano e, conseqüentemente, maior síntese de quinurenina em pacientes diabéticos (Figura 6 e 8). De acordo com Matsuoka e colaboradores (2017), esse metabolismo acelerado é indicativo de maior produção de vários metabólitos ativos. Em condições patológicas, o metabolismo TRP costuma ser mais direcionado para a produção de

ácido quinolínico, o qual apresenta ação neurotóxica por ativar receptores de NMDA (CHEN & GUILLEMIN, 2009). Em condições fisiológicas, esse metabolito é pouco produzido e sua concentração central e sistêmica é benéfica ao organismo (DEHHAGHI, KAZEMI & GUILLEMIN, 2019).

A quinurenina, primeiro metabólito produzido a partir do catabolismo do TRP pelaIDO, promove a ativação de receptores para aril hidrocarboneto (AhR) (SALLÉE et al., 2014). De acordo com DiNatale e colaboradores (2010), esses receptores medeiam cardiotoxicidade, inflamação vascular e um fenótipo pró-coagulante, pró-oxidante e pró-apoptóticos de células vasculares. Já Wang e colaboradores (2010), demonstraram em ensaios pré-clínicos que a quinurenina é um metabólito vasoativo do TRP que apresenta uma potente ação vasodilatadora independente de NO e, sendo assim, contribui para a diminuição da pressão arterial.

A dosagem dos níveis de TRP e KYN permite estimar a atividade da IDO por meio da razão KYN/TRP. A partir desta estratégia, observou-se que a atividade da IDO encontra-se aumentada em pacientes diabéticos (Figura 8). Cernaro e colaboradores (2020) evidenciaram que a via das quinureninas está envolvida na fisiopatologia do diabetes mellitus por meio da indução da expressão da IDO por inflamação, havendo maior atividade da IDO em pacientes diabéticos com histórico de doença cardiovascular em comparação a pacientes sem comorbidade associada.

De acordo com os resultados obtidos pela avaliação dos metabólitos da via das quinurenina (Figura 7 - A e C), foi possível observar que o quadro diabético deslocou o metabolismo do TRP para maior síntese de Ac. KYN e 3HKYN. Bardgett, Mccarthy & Stocker (2010) haviam reportado que Ac. KYN desencadeia efeitos protetores vasculares em humanos, porém, dados de DiNatale e colaboradores (2010) apontam que esse metabólito, via ativação de receptores AhR, induz grandes danos vasculares.

Ac. KYN e 3HKYN apresentam a KYN como mesmo precursor, porém são ativados em condições e formas diferentes. A via KYN- Ac. KYN, mediada pela enzima quinurenina-amino-transferase (KAT), é processo pelo qual a KYN é catabolizada pela KAT para a formação do Ac. KYN (GUIDETTI et al., 2007). A via KYN-3HKYN, mediada pela enzima quinurenina-3-monooxigenase (KMO), é o processo pelo qual a

KYN é catabolizada pela KMO para a formação de 3HKYN (CHEN & GUILLEMIN, 2009).

No sistema nervoso central, Ac. KYN apresenta grande efeito neuroprotetor por antagonizar receptores glutamatérgicos NMDA e receptores α -7 nicotínicos (HILMAS et al., 2001; STONE & ADDAE, 2002). Em condições inflamatórias, a produção do metabólito neurotóxico 3HKYN aumenta e torna-se maior do que Ac. KYN. Esse desequilíbrio entre 3HKYN e Ac. KYN ocorre principalmente pela maior ativação de monócitos ativados no estado inflamatório (CHIARUGI et al., 2001).

A neurotoxicidade desencadeada pelo metabólito 3HKYN, é mediada por radicais livres produzidos por sua auto-oxidação (VASQUEZ et al., 2000). Além disso, o aumento em 3HKYN leva a aumento na produção do próximo metabólito ativo da via, o ácido quinolínico. Dessa forma, o quadro inflamatório resulta em um estado de desequilíbrio, onde os efeitos neurodegenerativos de 3HKYN e ácido quinolínico se sobrepõem ao efeito neuroprotetor de Ac. KYN (MYINT & KIM, 2014).

Outros dois metabólitos analisados foram o Ácido antranílico (AA) e o Ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA). Zhang e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento subcrônico com 3-HAA, em modelo de camundongos com tendência a aterosclerose (Ldlr^{-/-}), reduziu significativamente o tamanho das lesões aórticas, além de modular respostas inflamatórias locais e sistêmicas. Enquanto que o AA apresenta significativo efeito anti-inflamatório central e periférico (MAES et al., 2007).

Os dados metanalíticos obtidos a partir dos estudos incluídos que dosaram Ac. KYN e 3HAA não demonstraram diferença significativa nos níveis destes metabólitos no quadro diabético. Esses dados sugerem que o efeito benéfico obtido em ensaios pré-clínicos não se mantém na patologia clínica do diabetes, pois nestas condições não aparentam modular respostas associadas ao diabetes.

Embora esta metanálise tenha evidenciado que a ativação da via das quinureninas pode ser um fator preditor para o desenvolvimento e complicações associadas ao diabetes, algumas limitações devem ser apontadas e discutidas: a ativação via das quinureninas dá origem a vários metabólitos biologicamente ativos. O ácido picolínico e quinolínico, dois importantes metabólitos da via, com ações benéficas e prejudiciais em determinados sistemas, respectivamente, não foram dosados nos estudos, limitando uma melhor compreensão da relação da via com o

quadro diabético. De acordo com resultados encontrados por Kanchanatawan e colaboradores (2018), quanto maior o valor da razão obtida a partir dos níveis de ácido quinolínico e quinurênico (QUIN/ Ac. KYN), maior é a atividade neuroproterora associada à via. A análise do ácido picolínico forneceria mais informações relacionadas aos efeitos diversos e complexos da via em respostas neurológicas, metabólicas, inflamatórias e vasculares.

Outro ponto relevante é referente aos estudos incluídos não fornecerem dados suficientes para fazer uma correlação entre os níveis de quinureninas com fatores associado ao quadro inflamatório ou disfunções características do diabetes, como a dosagem de espécies reativas de oxigênio, citocinas pró e anti-inflamatórias e biodisponibilidade de óxido nítrico, uma vez que vários artigos reportam a influência das quinureninas sobre esses fatores.

Por conta disso, não foi possível avaliar o impacto desses mediadores na ativação dessa via responsável por modular várias respostas em diferentes sistemas. Por isso, mesmo com todos estes estudos voltados para elucidar as funções desencadeadas por essa via, ainda são necessárias mais pesquisas para compreender claramente a complexa interação entre triptofano, IDO e quinureninas entre si e com os sistemas. Tanto em condições fisiológicas, mas principalmente em condições patológicas.

2.2.6 CONCLUSÕES

Embora os dados deste estudo não sejam suficientes para identificar os mecanismos envolvidos na ativação da via das quinureninas no quadro diabético, a presente metanálise, composta por 12 estudos clínicos, evidenciou nestes pacientes ocorrer aumento significativo da depleção do triptofano pela enzima IDO. A ativação da via resulta em níveis aumentados dos metabólitos ativos quinurenina, ácido quinurênico e ácido 3-hidroxiquinurenina, indicando uma forte associação da ativação da via com o quadro diabético. Não foram encontradas alteração nos níveis de ácido antranílico e 3-hidroxi-antranílico nos pacientes. Futuros estudos avaliando esta via com base nas limitações apontadas são requeridos para validação dos nossos achados.

2.2.7 REFERÊNCIAS

- AHMADOU, M.A.; JOHA, M.S. Kynurenine-modified serum proteins are a new marker of cardiovascular disorders developing in type 2 diabetes. **Int J Acad Sci Res**, v. 3, p. 101-105, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**.v.25, p.S5-S20, 2002.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v.37, p.S81-S90, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**. v.41, p.S13-S27, ADA, 2018.
- BARDGETT, M.E.; MCCARTHY, J.J.; STOCKER, S.D. Glutamatergic receptor activation in the rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoexcitatory response to hyperinsulinemia. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 284-290, 2010.
- BERTOLUCI, M.C; CÉ, G.V.; SILVA, A.M.V.; PUÑALES, M.K.C. Disfunção Endotelial no Diabetes Melito Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.52(2), p.416-26, 2008.
- CERNARO, V. et al. P0716 RAAS inhibition modulates kynurenine levels in a CKD population with and without type 2 diabetes mellitus. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. Supplement_3, p. gfaa142. P0716, 2020.
- CHEN, Y.; GUILLEMIN, G.J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, p. IJTR. S2097, 2009.
- CHIA, C.W.; EGAN, J.M.; FERRUCCI, Li. Age-related changes in glucose metabolism, hyperglycemia, and cardiovascular risk. **Circulation research**, v. 123, n. 7, p. 886-904, 2018.
- CHIARUGI, A. et al. Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages. **Journal of neuroimmunology**, v. 120, n. 1-2, p. 190-198, 2001.
- DEHHAGHI, M.; KAZEMI, H.S.P.; GUILLEMIN, G.J. Microorganisms, tryptophan metabolism, and kynurenine pathway: A complex interconnected loop influencing human health status. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 12, p. 1178646919852996, 2019.
- DINATALE, B.C. et al. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 89-97, 2010.
- DONATH, M.Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 6, p. 465-476, 2014.
- GUIDETTI, P. et al. Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain. **Journal of neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 103-111, 2007.
- GENUTH, S. et al.; Comitê de Especialistas em Diagnóstico e Classificação de Diabetes Mellitus - Relatório de acompanhamento sobre o diagnóstico de diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v.26, p3160 – 3167, 2003
- GROSS, J.L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.46, p.16-26, 2002.
- HAFFNER, S.M. Coronary heart disease in patients with diabetes. **N Engl J Med**. v.342, p.1040-2, 2000.
- HILMAS, C. et al. The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: physiopathological implications. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 19, p. 7463-7473, 2001.
- HOZO, S.P.; DJULBEGOVIC, B.; HOZO, I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. **BMC medical research methodology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2005.

- HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; NAHAS, M. Obesity and Diabetes in the Developing World - A Growing Challenge. **N Engl J Med.** v.20, p.356-213, 2007.
- HUSSAIN, S.H. Activity of Indoleamine 2, 3 Dioxygenase (IDO) in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in Pakistan. **Journal of Rawalpindi Medical College**, v. 21, n. 2, p. 136-140, 2017.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF diabetes atlas. 5th ed. Brussels: **International Diabetes Federation**; 2012.
- KANCHANATAWAN, B. et al. Deficit, but not nondeficit, schizophrenia is characterized by mucosa-associated activation of the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway with highly specific increases in IgA responses directed to picolinic, xanthurenic, and quinolinic acid. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1524-1536, 2018.
- MALLMANN, N.H; LIMA, E.S.; LALWANI, P. Dysregulation of tryptophan catabolism in metabolic syndrome. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 16, n. 3, p. 135-142, 2018.
- MAES, M. et al. The immune effects of TRYCATs (tryptophan catabolites along the IDO pathway): Relevance for depression--And other conditions characterized by tryptophan depletion induced by inflammation. **Neuroendocrinology Letters**, v. 28, n. 6, p. 826-831, 2007.
- MÁNDI, Y.; VÉCSEI, L. The kynurenine system and immunoregulation. **Journal of neural transmission**, v. 119, n. 2, p. 197-209, 2012.
- MANGGE, H. et al. Obesity-related dysregulation of the tryptophan-quinurenina metabolism: role of age and parameters of the metabolic syndrome. **Obesity (Silver Spring)**. v.22(1), p.195-201, 2014.
- MATSUOKA, K. et al. Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults. **Diabetology international**, v. 8, n. 1, p. 69-75, 2017.
- MEDEIROS, C. et al. Prevalência dos fatores de risco para diabetes mellitus de servidores públicos. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 559-69, 2012.
- MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Med**, v. 21, p. e100097, 2009.
- MUDRY, J.M. et al. Direct effects of exercise on kynurenine metabolism in people with normal glucose tolerance or type 2 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, n. 7, p. 754-761, 2016.
- MUNIPALLY, P.K. et al. Evaluation of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 117, n. 5, p. 254-258, 2011.
- MYINT, A.M.; KIM, Y.K. Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 304-313, 2014.
- ORMAZABAL, V. et al. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovascular diabetology**, v. 17, n. 1, p. 122, 2018.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF consultation. Geneva: **WHO**; 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. Geneva: **WHO**, 2013.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil**. Brasília, DF: OPAS, 2016.
- OXENKRUG, G.F. Increased plasma levels of xanthurenic and kynurenic acids in type 2 diabetes. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 2, p. 805-810, 2015.
- PAPATHEODOROU, K. et al. Complications of diabetes 2017. **Journal of Diabetes Research**, 2018.
- PEDERSEN, E.R. et al. Associations of plasma kynurenines with risk of acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 2, p. 455-462, 2015.

- POLYZOS, K.A.; KETELHUTH, D.F. The role of the quinurenic pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. **An emerging field. Hamostaseologie**, v.35 (2), p.128-36, 2015.
- REBNORD, E.W. et al. The kynurenine: tryptophan ratio as a predictor of incident type 2 diabetes mellitus in individuals with coronary artery disease. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1712-1721, 2017.
- SALLÉE, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 934-949, 2014.
- STONE, T.W.; ADDAE, J.I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **European journal of pharmacology**, v. 447, n. 2-3, p. 285-296, 2002.
- TAKADA, A. et al. Measurement of tryptophan metabolites in healthy old men and patients of type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Food and Nutrition Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1206-1220, 2018.
- TAKADA, A. et al. Plasma Levels of Tryptophan Metabolites in Patients of Type 2 Diabetes Mellitus. In: **Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes**. Academic Press, p. 265-276, 2019.
- VAZQUEZ, S. et al. Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. **Free radical research**, v. 32, n. 1, p. 11-23, 2000.
- WANG, Y. et al. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nature medicine**, v. 16, n. 3, p. 279-285, 2010.
- WANG, Q. et al. Vitamin D inhibits COX-2 expression and inflammatory response by targeting thioesterase superfamily member 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289 (17), p. 11681-11694, 2014.
- ZHANG, L. et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lowers plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice. **European heart journal**, v. 33, n. 16, p. 2025-2034, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Increased indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in type 2 diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 31, n. 1, p. 223-227, 2016.

2.3 Artigo 3 – Desregulação na via das quinureninas como potencial marcador de desordens vasculares na gestação hiperglicêmica: artigo de hipótese

2.3.1 RESUMO

O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é caracterizado por um quadro hiperglicêmico identificado pela primeira vez durante a gestação é responsável por aumentar o risco de prematuridade, parto cesariano e de evolução para diabetes tipo 2, além predispor o feto a um maior risco de macrosomia, hiperinsulinemia e obesidade ao longo da vida. Apesar dos diversos avanços já alcançados em relação ao diagnóstico e ao tratamento das doenças típicas da gestação, o DMG ainda é responsável por grande número de mortes maternas e fetais, bem como de diversas outras consequências não letais como complicações vasculares no organismo materno. Os mecanismos envolvidos no quadro ainda precisam ser esclarecidos, porém fortes evidências indicam uma associação positiva do desenvolvimento do DMG com um perfil de ativação desregulado da via das quinureninas. Ante o exposto, nossa hipótese é que a ativação da via no quadro de diabetes gestacional é direcionada para a síntese de quinureninas no intuito de controlar os danos da resposta inflamatória causada pelo quadro hiperglicêmico em detrimento do desenvolvimento normal da gestação. Entretanto, com o perfil de ativação desregulado, resulta na síntese de metabólitos com funções voltadas para melhorar ou piorar dos danos causados pelo quadro hiperglicêmico.

Palavras-chave: Diabetes Gestacional; Disfunção vascular; Triptofano; Quinurenina.

2.3.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO

No desenvolvimento da gravidez saudável, ocorrem várias alterações hemodinâmicas para evitar uma sobrecarga no sistema cardiovascular materno, o que permite o desenvolvimento adequado do feto e a gestação (TROIANO, 2018). A circulação uteroplacentária é uma das mais afetadas, pois aumenta em 25% o fluxo cardíaco total (SANGHAVI & RUTHERFORD, 2004). Estas alterações decorrem de uma série de mecanismos endócrinos e vasculares que resultam em maior dilatação e, conseqüente, diminuição da resistência vascular (MYATT & WEBSTER, 2009).

Nos primeiros seis meses de gestação ocorre diminuição da pressão arterial média, resultante da diminuição da resistência periférica. Essas alterações acontecem de forma progressiva atingindo um platô por volta do oitavo mês de gestação (JAMES,

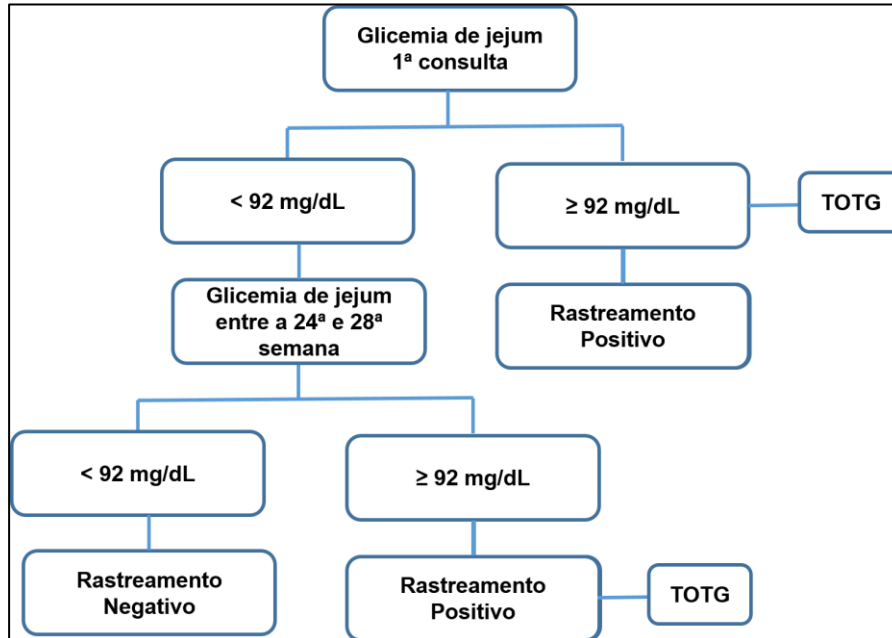
CHAMLEY & CLARK, 2017). Adicionalmente, ocorre também uma diminuição da resposta pressora a agentes constritores, como angiotensina II, catecolaminas e outras substâncias vasopressoras (SANGHAVI & RUTHERFORD, 2004).

Entre os fatores responsáveis por essas alterações hemodinâmicas que levam à hiporresponsividade característica da gravidez estão a ação do endotélio no controle do tônus vascular via produção de óxido nítrico (NO), importante fator relaxante derivado do endotélio, e a produção aumentada de autacóides como as prostaciclina (PGI₂), importantes para a manutenção da placenta (XIAO, PEARCE & ZHANG, 2001). Estes fatores mantêm a baixa resistência vascular, além de atenuar a ação de substâncias vasoconstritoras (TROIANO, 2018).

Desregulação dos mecanismos homeostáticos envolvidos na gestação normal estão associados ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia e diabetes (THILAGANATHAN & KALAFAT, 2019; FATIHOGLU et al, 2021). Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos descritos para o diabetes tipo 2, incluindo, ainda, idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, além de antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, entre outros (OPAS, 2016).

Como não há um consenso sobre a melhor estratégia de rastreamento e diagnóstico do DMG, são aceitas diretrizes propostas por várias sociedades científicas. A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) preconiza uma investigação dos níveis glicêmicos no primeiro trimestre da gestação, de preferência na primeira consulta pré-natal e entre a 24^a e 28^a semana da gravidez (Figura 2). Se o rastreamento for positivo na primeira consulta, a gestante é diagnosticada com DM pré-existente. Alterações glicêmicas durante a gestação são confirmadas por meio da realização do Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) para o diagnóstico de DMG (SBD, 2017).

Figura 9 - Procedimento para o rastreamento do Diabetes gestacional. Mulheres grávidas com índice glicêmico inferior a 85 mg/dL apresentam rastreamento negativo, porém a dosagem da glicemia ainda é necessária na 24ª e 28ª semana. Em mulheres grávidas com índice glicêmico superior a 92 mg/dL, que apresentam rastreamento positivo, devem imediatamente ser realizado o Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG).



(SBD, 2017).

No Brasil, existem poucos dados estatísticos direcionados à prevalência de DMG na população. Estudo realizado pelo Instituto Brasileiro de Diabetes Gestacional avaliou a prevalência de DMG em cerca de 5.000 gestantes atendidas no sistema público de cinco capitais. Nestes, os valores de referência propostos pela OMS à época (jejum ≥ 126 mg/dL e/ou 2 h ≥ 140 mg/dL) foram utilizados para avaliação. Os dados revelaram prevalência de 7,6% de DMG na população. Entretanto, com a adoção dos novos critérios para diagnósticos de DMG respaldados pela OMS e SBD, estima-se que essa porcentagem seja aumentada para aproximadamente 18% (OPAS, 2016).

A resistência à insulina apresenta-se como um fator-chave para complicações vasculares observadas no DMG, com disfunção endotelial e relaxamento vascular prejudicado. A lesão endotelial é o ponto central na fisiopatologia de doenças associadas à gestação nesta condição, caracterizada por menor produção e ação de substâncias vasodilatadoras do endotélio vascular (IDF, 2015).

O endotélio vascular da paciente com DMG passa por modificações morfológicas e funcionais devido à exposição contínua a altos níveis de glicose, característico da

doença, tornando-se um fator de risco para o desenvolvimento de doenças micro e macrovasculares devido à ativação de vias inflamatórias, com expressão aumentada de moléculas de adesão, aumento de estresse oxidativo e indução de apoptose (HARREITER, DOVJAK & KAUTZKY, 2014).

Em estudo realizado por Meraji e colaboradores (1987), foi comprovada a ocorrência de alterações morfológicas e funcionais das células endoteliais de animais diabéticos, resultado de um processo acelerado de perda do endotélio vascular. Esses dados corroboraram os estudos de Ho e colaboradores (2000), onde verificou-se em modelo *in vitro*, que altas concentrações de glicose afetam as células endoteliais em nível celular, produzindo retardo em sua replicação. Este fenômeno é explicado pela ativação de vias inflamatórias que desencadeiam o aumento na expressão de moléculas de adesão e cicloxigenase 2 (WANG et al., 2014).

Um quadro persistente de inflamação gera respostas fisiológicas compensatórias importantes contra os danos causados pelo processo inflamatório. O aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e, principalmente, interferon- γ são potentes indutores da enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual cataboliza 95% do triptofano livre para a ativação da via das quinureninas, num processo que envolve a ação de enzimas e síntese de vários metabólitos ativos (CHEN & GUILLEMIN, 2009).

Devido a sua estreita relação com o sistema imunológico, a via da quinurenina tem sido implicada em uma variedade de doenças e distúrbios, incluindo a gravidez pré-eclâmptica, diabética e doenças cardiovasculares (PEDERSEN et al., 2013), Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e neoplasias (VÉCSEI et al., 2013). Há relatos que a síntese dos metabólitos da via esteja envolvida tanto na melhora (TISZLAVICZ et al., 2011) quanto na piora dessas condições (ZUO et al., 2016).

2.3.3 HIPÓTESE

Gestação e diabetes são duas condições que requerem maior catabolismo do TRP para síntese de quinureninas e seus metabólitos ativos. Na gestação, a via atua

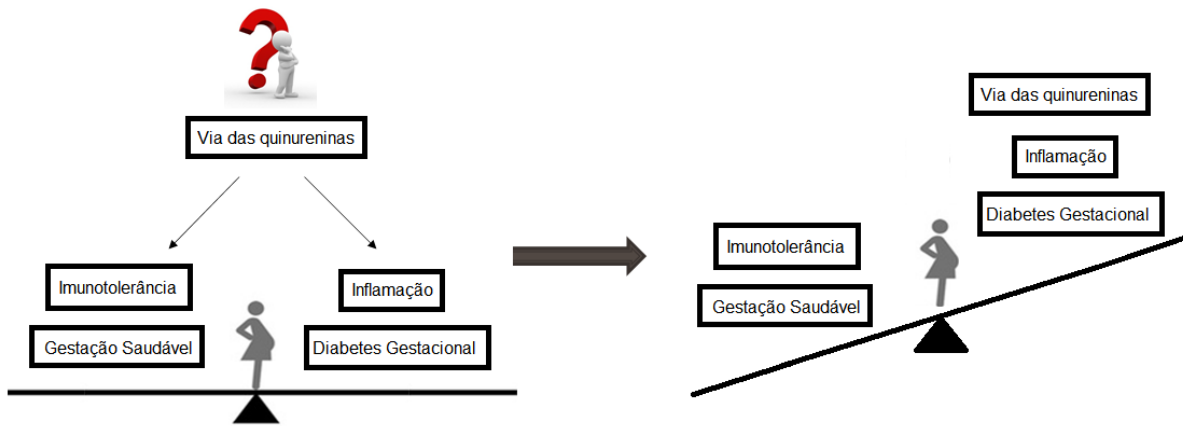
como importante fator regulador da imunotolerância materno-fetal desde o início até o final da gestação (IWAHASHI et al., 2017). Além disso, esses metabólitos, quando presentes nos vasos placentários e maternos, também contribuem para manter a vascularização ideal para suprir mãe e feto (BLASCHITZ et al., 2011). Já no diabetes, a via apresenta um papel de auto-regulação compensatória, cuja ação é tentar minimizar os danos inflamatórios causados pelo quadro hiperglicêmico (AHMADOU & JOHA, 2015)

Várias hipóteses têm sido propostas para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação da via das quinureninas, principalmente em quadros patológicos. No entanto, cada vez mais vêm sendo publicados trabalhos que demonstram uma ação dicotômica da via, onde são possíveis encontrar metabólitos com efeito protetor sobre vários sistemas (ZHANG et al., 2012), e ao mesmo tempo, metabólitos que apresentam grande potencial danoso aos mesmos sistemas. Além disso, parte desses mesmos metabólitos variam suas respostas de acordo com as patologias avaliadas (ZUO et al., 2016).

Dessa forma, é importante esclarecer o comportamento da via das quinureninas no diabetes gestacional, uma condição onde a via é requerida tanto para o desenvolvimento da gestação, quanto para regular os danos inflamatórios causados pela hiperglicemia. Considerando esse papel dicotômico da via e todos os avanços sobre o papel das quinureninas em diferentes situações fisiológicas e patológicas, nossa hipótese admite que na diabetes gestacional, uma desregulação na via direciona a síntese de quinureninas para controlar os danos da resposta inflamatória causada pelo quadro hiperglicêmico em detrimento do desenvolvimento normal da gestação (Figura 10).

Ainda nesse sentido, hipotetizamos também que no DMG, onde o quadro inflamatório e suas repercussões estão instaladas no organismo, a via das quinureninas passa a sintetizar grupos de metabólitos distintos que contribuem tanto para a melhora, quanto para a piora dos danos causados pelo quadro hiperglicêmico, gerando um perfil de metabólitos que podem atuar como importantes marcadores de alterações metabólicas envolvidas no quadro de Diabetes gestacional.

Figura 10: Esquema representativo da ação da via das quinureninas na gestação e que fundamentam a hipótese do perfil de ativação da via das quinureninas direcionado a compensar os danos causados pelo diabetes gestacional.



2.3.4 FUNDAMENTAÇÃO DA HIPÓTESE

O triptofano é um aminoácido essencial precursor de vários compostos biologicamente ativos (POLYZOS & KETELHUTH 2015). Pode ser catabolizado por duas principais vias, a via da serotonina, a qual cataboliza cerca de 2% deste aminoácido, e a via das quinurenianas, responsável pelo catabolismo de 95% do triptofano livre (JONES et al., 2015). Ao longo dos anos, tem sido relatado o envolvimento de diferentes metabólitos da via das quinureninas na manutenção de processos fisiológicos e patológicos.

Uma série de mecanismos imunossupressores placentários atuam na proteção do feto durante a gravidez normal (SAMSTEIN et al., 2012). A remodelação de artérias espiraladas e o processo de placentação atenuam o risco de rejeição fetal (ROBERTSON et al., 2018). Iwahashi e colaboradores (2017), demonstraram que uma desregulação daIDO nos trofoblastos placentários pode levar a uma disfunção imunológica que resulta em vias angiogênicas desequilibradas ou inflamação excessiva.

Zardoya e colaboradores (2018) demonstraram que o TRP, regulado pelaIDO, promove importante ação vasodilatadora independente do endotélio na microcirculação placentária e essa ação é perdida em quadros de pré-eclâmpsia e

restrição de crescimento fetal por redução significativa da expressão e atividade da IDO.

Kudo e colaboradores (2003) e Grozdics e colaboradores (2014) demonstraram um aumento da atividade sistêmica da IDO em mulheres grávidas, enquanto que em mulheres com gravidez pré-eclâptica, a expressão e atividade da IDO placentária encontra-se reduzida. Keaton e colaboradores (2019) demonstraram ainda que a gravidade dos sintomas de pré-eclâpsia está associada à redução de expressão e a atividade IDO placentária.

Ban e colaboradores (2013) demonstraram que tanto a expressão como a atividade da IDO na placenta e decídua foram significativamente menores em grávidas que sofreram aborto espontâneo recorrente. Zong e colaboradores (2016) demonstraram que a diminuição da ação da IDO pode estar associada a complicações relacionadas ao aborto espontâneo recorrente por afetar a proliferação do trofoblasto e a migração através dessa via.

No Diabetes ocorre aumento significativo na depleção de triptofano pela IDO e, conseqüentemente, maior síntese de quinureninas. Nessa condição patológica, o metabolismo TRP costuma ser mais direcionado para a produção de ácido quinolínico, o qual apresenta ação neurotóxica (CHEN & GUILLEMIN, 2009).

Wang e colaboradores (2010) demonstraram que em condições inflamatórias, a quinurenina atua como vasoativo com potente ação vasodilatadora independente de NO. Em pacientes diabéticos, a atividade da IDO aumenta de forma significativa, principalmente em pacientes com história de doença cardiovascular (Cernaro et al., 2020).

De acordo com Bardgett, Mccarthy & Stocker (2010), o quadro diabético desloca o metabolismo do TRP para maior síntese de ácido quinurênico, metabólito que apresenta efeitos protetores vasculares em humanos, porém em outro estudo realizado por DiNatale e colaboradores (2010), esse mesmo metabólito foi responsável por causar grandes danos vasculares.

Zhang e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento subcrônico do metabólito ácido 3-hidroxiquinurenina reduziu significativamente o tamanho das lesões aórticas de camundongos, além de modular respostas inflamatórias locais e

sistêmicas. Na mesma linha, o ácido antranílico apresentou significativo efeito anti-inflamatório central e periférico (MAES et al., 2007).

O quadro de resistência insulínica no diabetes gestacional pode causar disfunção endotelial e ativação inflamatória crônica, com aumento do risco cardiovascular e de evolução para o diabetes tipo 2, além aumentar o risco de prematuridade, parto cesariana, aborto e de evolução para diabetes tipo 2 (VILLAR et al., 2006). Os mecanismos envolvidos ainda precisam ser esclarecidos, porém fortes evidências indicam que a desregulação da via das quinureninas está diretamente associada ao quadro característico do DMG.

2.3.5 CONCLUSÕES

Os dados publicados ao longo dos anos vêm evidenciando uma associação do surgimento de patologias relacionadas a gestação com uma desregulação da ativação da via das quinureninas. No diabetes gestacional, o organismo feminino apresenta duas condições em que são requeridas a ativação das quinureninas: o desenvolvimento da imunotolerância materno-fetal e resposta compensatória ao dano causado pela hiperglicemia. Nesse sentido, uma maior ativação da via na tentativa de evitar os danos causados pela hiperglicemia pode ser suficiente para desregular o desenvolvimento da imuntolerância necessária para o desenvolvimento fetal, bem como as adaptações hemodinâmicas relacionadas ao organismo materno.

2.3.6 REFERÊNCIAS

AHMADOU, M.A.; JOHA, M.S. Kynurenine-modified serum proteins are a new marker of cardiovascular disorders developing in type 2 diabetes. *Int J Acad Sci Res*, v. 3, p. 101-105, 2015.

BAN, Y. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase levels at the normal and recurrent spontaneous

abortion fetal–maternal interface. *Journal of international medical research*, v. 41, n. 4, p. 1135-1149, 2013.

BARDGETT, M.E.; MCCARTHY, J.J.; STOCKER, S.D. Glutamatergic receptor activation in the rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoexcitatory response to

hyperinsulinemia. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 284-290, 2010.

BLASCHITZ, A. et al. Vascular endothelial expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the fetomaternal interface. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21774, 2011.

CERNARO, V. et al. P0716 RAAS inhibition modulates kynurenine levels in a CKD population with and without type 2 diabetes mellitus. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. Supplement_3, p. gfaa142. P0716, 2020.

CHEN, Y.; GUILLEMIN, G.J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, p. IJTR. S2097, 2009.

DINATALE, B.C. et al. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 89-97, 2010.

FATIHOGU, E. et al. Gestational diabetes mellitus and early hemodynamic changes in fetus. 2021.

GROZDICS, E. et al. B7 co-stimulation and intracellular indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

HARREITER, J.; DOVJAK, G.; KAUTZKY-WILLER, A. Gestational diabetes mellitus and cardiovascular risk after pregnancy. **Women's Health**, v. 10, n. 1, p. 91-108, 2014.

HO, F.M. et al. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3. **Circulation**, v. 101, n. 22, p. 2618-2624, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels: **International Diabetes Federation**; 2015.

IWAHASHI, N. et al. Downregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in the villous stromal endothelial cells of placentas with preeclampsia. **Journal of reproductive immunology**, v. 119, p. 54-60, 2017.

JAMES, J.L.; CHAMLEY, L.W.; CLARK, A.R. Feeding your baby in utero: how the uteroplacental circulation impacts pregnancy. **Physiology**, v. 32, n. 3, p. 234-245, 2017.

JONES, S.P. et al. Expression of the kynurenine pathway in human peripheral blood mononuclear cells: implications for inflammatory and neurodegenerative disease. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131389, 2015.

KEATON, S.A. et al. Altered tryptophan catabolism in placentas from women with preeclampsia. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 12, p. 1178646919840321, 2019.

KUDO, Y. et al. Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2, 3-dioxygenase in preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 188, n. 3, p. 719-726, 2003.

MAES, M. et al. The immune effects of TRYCATs (tryptophan catabolites along the IDO pathway): Relevance for depression--And other conditions characterized by tryptophan depletion induced by inflammation. **Neuroendocrinology Letters**, v. 28, n. 6, p. 826-831, 2007.

MERAJI, S. et al. Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. **Diabetes**. v. 36, n. 8, p. 978-981, 1987.

MYATT, L.; WEBSTER, R.P. Vascular biology of preeclampsia. **J. Thromb. Haemost.** v. 7(3), p.375-384, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil**. Brasília, DF: OPAS, 2016.

POLYZOS, K. A.; KETELHUTH, D. F. J. The role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. **Hämostaseologie**, v. 35, n. 02, p. 128-136, 2015.

PEDERSEN, Eva Ringdal et al. Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. **European heart journal**, v. 34, n. 34, p. 2689-2696, 2013.

- ROBERTSON, S.A. et al. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 10, p. 4224-4235, 2018.
- SAMSTEIN, R.M. et al. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 29-38, 2012.
- SANGHAVI, Monika; RUTHERFORD, John D. Cardiovascular physiology of pregnancy. **Circulation**, v. 130, n. 12, p. 1003-1008, 2014.
- SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018**. São Paulo: Clannad; 2017.
- THILAGANATHAN, Basky; KALAFAT, Erkan. Cardiovascular system in preeclampsia and beyond. **Hypertension**, v. 73, n. 3, p. 522-531, 2019.
- TISZLAVICZ, Zoltán et al. Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor- α (TNF- α) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 383, n. 5, p. 447-455, 2011.
- TROIANO, N.H. Physiologic and hemodynamic changes during pregnancy. **AACN advanced critical care**, v. 29, n. 3, p. 273-283, 2018.
- VÉCSEI, László et al. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 1, p. 64-82, 2013.
- VILLAR, J. et al. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 194, n. 4, p. 921-931, 2006.
- WANG, Y. et al. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nature medicine**, v. 16, n. 3, p. 279-285, 2010.
- WANG, Q. et al. Activation of NAD (P) H oxidase by tryptophan-derived 3-hydroxykynurenine accelerates endothelial apoptosis and dysfunction in vivo. **Circulation research**, v. 114, n. 3, p. 480-492, 2014.
- XIAO, D.; PEARCE, W.J.; ZHANG, L. Pregnancy enhances endothelium-dependent relaxation of ovine uterine artery: role of NO and intracellular Ca²⁺. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** v.281(1), p.H183-90, 2001.
- ZARDOYA-LAGUARDIA, P. et al. Endothelial indoleamine 2, 3-dioxygenase-1 regulates the placental vascular tone and is deficient in intrauterine growth restriction and preeclampsia. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- ZHANG, L. et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lowers plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice. **European heart journal**, v. 33, n. 16, p. 2025-2034, 2012.
- ZONG, S. et al. Dysregulated expression of IDO may cause unexplained recurrent spontaneous abortion through suppression of trophoblast cell proliferation and migration. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.
- ZUO, Hui et al. Plasma biomarkers of inflammation, the kynurenine pathway, and risks of all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality: the Hordaland Health Study. **American journal of epidemiology**, v. 183, n. 4, p. 249-258, 2016.

2.4 Artigo 4 - Disfunção Vascular em Modelos Experimentais de Diabetes Mellitus Tipo 2 em Ratos: Uma Revisão Sistemática

2.4.1 RESUMO

No Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), a ativação de vias inflamatórias culmina numa disfunção endotelial que resulta em distúrbios vasculares, neurológicos, visuais, auditivos e renais. O estudo da disfunção vascular em ratos DM 2 tem sido realizado em diferentes modelos, seja por indução ou em animais geneticamente modificados classificados como espontaneamente diabéticos, porém o comprometimento vascular nem sempre é frequente, ou quando é, vêm associados a várias outras patologias. Para garantir uma melhor elucidação dos resultados já publicados na literatura, esta revisão sistemática teve como objetivo identificar protocolos que apresentem um padrão de iniciação e desenvolvimento de diabetes e, conseqüentemente, resultados confiáveis e homogêneos sobre disfunção vascular. Para isso, foi realizado um protocolo para a elaboração de revisões sistemáticas e metanálises, no qual dois pesquisadores calibrados realizaram uma busca sistemática da literatura de artigos publicados e enquadrados em critérios pré-definidos. Após a triagem, 30 estudos se adequaram à proposta do presente estudo. Em protocolos de reatividade vascular, a função endotelial foi analisada em ratos induzidos ou naturalmente diabéticos (modelo genético). Com a compilação dos dados extraídos dos artigos, foi observado que os modelos mais utilizados são os modelos genéticos, porém diferentes métodos de indução que utilizam dose única de estreptozotocina (STZ) também são bastante utilizados. A indução com baixas doses de estreptozotocina em combinação com frutose oral ou dieta hiperlipídica (DH) apresentou maior e menos variável comprometimento da resposta vasodilatadora em ratos diabéticos em comparação a ratos controle, $47,57 \pm 3,8\%$ e $44,40 \pm 13,8$. As evidências demonstraram que os modelos genéticos ou induzidos com alta dose de estreptozotocina apresentam disfunção endotelial menos significativa e mais variável, $24,4 \pm 3,89\%$ e $23,37 \pm 17,15\%$, respectivamente. Na avaliação da viabilidade do endotélio vascular por meio dos níveis de NO e seus derivados, houve uma expressiva redução dos níveis de NO no grupo STZ+DH ($71,24\% \pm 10,64$). No modelo de DM2 induzido por alta dose de STZ, a redução foi de $51,65\% \pm 11,31$ e nos modelos genéticos de $35,65\% \pm 6,34$. Dessa maneira, os resultados encontrados nessa revisão sistemática sugerem que os modelos de diabetes tipo 2 induzidos com baixas doses de estreptozotocina em combinação com uma dieta rica em gordura ou administração oral de frutose fornecem uma maneira mais confiável de conduzir estudos de disfunção vascular em ratos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 2; Vasodilatação; Aorta; Modelos animais.

2.4.2 INTRODUÇÃO/REVISÃO

As doenças cardiovasculares são causa de mortalidade considerável em todo o mundo, responsáveis por aproximadamente 31% das mortes globais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 17,7 milhões de pessoas morreram por

complicações cardiovasculares no ano de 2016 (WHO, 2016). Um dos fatores que contribuem para essa condição é a Síndrome Metabólica (SM), caracterizada por um conjunto de fatores de risco derivados de alterações cardiometabólicas como hipertensão, obesidade, dislipidemia e diabetes, os quais acentuam o risco de acidente vascular cerebral, aterosclerose e doença cardíaca isquêmica (HUANG, 2009; LIRA NETO, 2017).

O aumento na incidência e prevalência do Diabetes mellitus tipo 2, característico da SM, além de ser um dos principais problemas de saúde no Brasil, eleva o custo médico-social. Muito disto pode ser justificado por complicações recorrentes como as doenças cerebrovasculares, arterial coronariana, vascular de extremidades, insuficiência cardíaca e insuficiência renal crônica (MARCHINI et al., 2015).

A ordem de progressão dos eventos bioquímicos presentes no DM2 humano inicia-se com resistência insulínica, que leva à hiperinsulinemia compensatória, disfunção da célula beta pancreática, intolerância a glicose e finalmente ao quadro hiperglicêmico do DM2, com complicações macro e microvascular que perfazem a maioria das morbi-mortalidades associadas à doença (WANG, 2014).

As complicações vasculares são derivadas da ruptura metabólica presente nessa condição, que induz eventos na parede vascular como a disfunção endotelial, estresse oxidativo, inflamação, agregação plaquetária, vasoconstrição e, conseqüentemente, formação de placas ateroscleróticas (RUDDY et al., 2009). Essas complicações estão comumente associadas à diminuição dos níveis de fatores relaxantes e aumento de fatores contráteis derivados do endotélio por aumento da atividade de espécies reativas de oxigênio (SENA, PEREIRA & SEIÇA, 2013).

O endotélio vascular é uma camada única de epitélio pavimentoso que reveste o interior dos vasos sanguíneos e faz interconexão entre o sangue e o músculo liso vascular. Ele é responsável pela modulação do tônus vascular e exerce o controle das respostas vasodilatadoras ou vasoconstritoras locais em resposta a alterações que ocorrem no fluxo sanguíneo, bem como na exposição a agentes vasoativos (CERAVOLO et al., 2012).

No paciente com DM2, o endotélio vascular passa por modificações morfológicas e funcionais devido à exposição contínua a altos níveis de glicose, característico da doença. Há aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento de estresse

oxidativo e indução de apoptose, culminando na ativação de vias inflamatórias (DASU e JIALAL, 2010; GALVÃO, 2014).

Meraji e colaboradores (1987) relataram a ocorrência de alterações morfológicas e funcionais de células endoteliais em animais diabéticos, resultado de um processo acelerado de perda do endotélio vascular. Esses dados corroboraram os estudos de Ho e colaboradores (2000), que observaram retardo na replicação de células endoteliais em cultura com altas concentrações de glicose (WANG et al., 2014).

O prejuízo da vasodilatação endotélio-dependente é a principal característica da disfunção endotelial na patogênese da doença vascular diabética. Foi demonstrado que a vasodilatação mediada por óxido nítrico (NO), prostaciclina ou fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF) está prejudicada em diferentes leitos vasculares, tanto em modelos animais quanto em pacientes diabéticos (DE VRIESE et al., 2000).

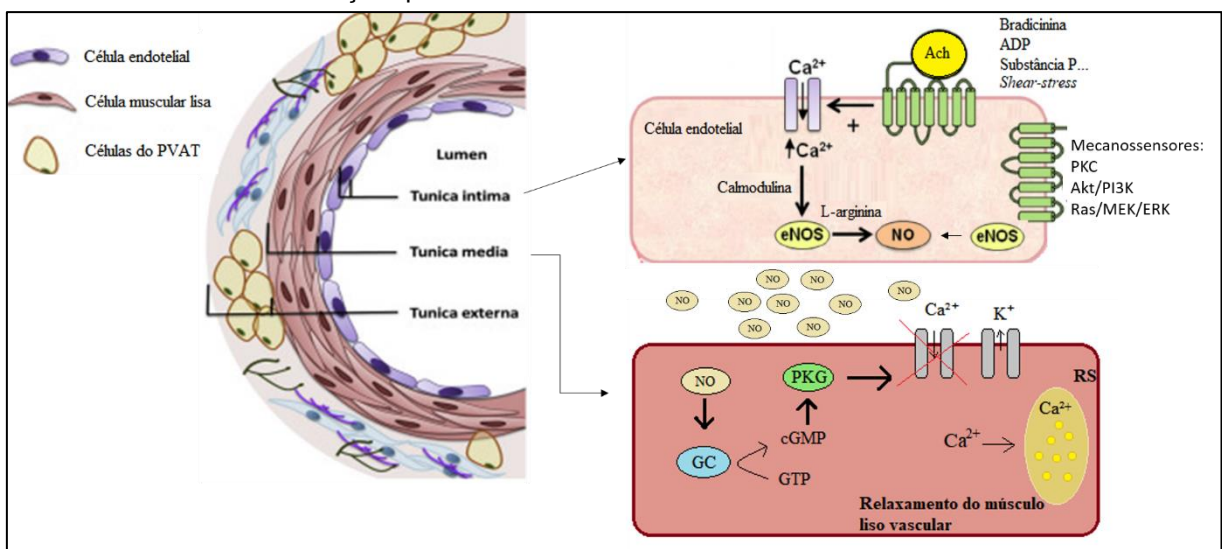
O óxido nítrico é um radical livre de suma importância na mediação de processos biológicos essenciais (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Dependendo do micro-ambiente, pode desenvolver ações benéficas ou prejudiciais ao organismo. Em condições fisiológicas, tem grande importância na proteção do vaso sanguíneo, no processo de relaxamento vascular, além de atuar como mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, sendo capaz de destruir patógenos e células tumorais (KATSUKI, et al. 1977; VAN DEN OEVER et al., 2010). No entanto, em situações de estresse oxidativo, o metabolismo do NO é potencialmente tóxico, gerando intermediários reativos de oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (MOILANEN & VAPPATALO, 1995).

O NO é sintetizado a partir da oxidação da L-arginina, reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (NOS endotelial e NOS neuronal) ou induzível (i-NOS), (FÖRSTERMANN, 2010). Welch e Loscalzo (1994) demonstraram que o NO derivado do endotélio difunde-se livremente através das membranas biológicas, sendo responsável pela ativação da enzima Guanilato Ciclase (GC) do músculo liso vascular (Figura 11) e seu consequente estímulo à formação de Guanosina Monofosfato cíclica (GMPc) a partir da Guanosina Trifosfato (GTP) (IGNARRO, 1992; FRANCIS et al, 2010). O GMPc, ativa quinases intracelulares como a proteína quinase G, as quais ativam processos de redução do influxo, inibição da liberação e aumento do sequestro

de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, respostas estas responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa vascular (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

A NO-sintase endotelial (eNOS) pode ser ativada por vários estímulos, seja de forma dependente ou independente de cálcio. Em sua forma inativa, encontra-se associada a proteína Caveolina-1 (Cav-1). O aumento da concentração de cálcio intracelular gerado por agonistas como Adenosina Difosfato (ADP), bradicinina, substância P, entre outros, promove a dissociação da ligação eNOS+Cav-1 e a formação do complexo cálcio/calmodulina resulta na ativação da eNOS pela via dependente de cálcio (GRATTON, BERNATCHEZ & SESSA, 2004).

Figura 11 – Estrutura da parede arterial, composta de três camadas: camada de células endoteliais, células musculares lisas vasculares e de células do tecido adiposo perivascular, fibroblastos, fibras colágenas e terminações nervosas. Esquema da regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico através de diferentes vias de sinalização que resultam no relaxamento da musculatura lisa vascular



(Adaptado de Zhao, Vanhoutte & Leung, 2015).

Outro mecanismo de ativação da eNOS (independente de cálcio) ocorre por meio da ativação de mecanossensores (proteínas de membrana como os canais iônicos, proteína Gs, entre outros) sensíveis ao aumento do fluxo sanguíneo pulsátil e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular, evento denominado de estresse de cisalhamento ou shear stress (Figura 3). O shear stress é um potente estimulador da produção do NO atuando por ativação da PI3K/Akt, da Ras/MEK/ERK, da c-Src e da PKC, vias que fosforilam e ativam a eNOS (MORAES et al., 2008).

Em conjunto, a liberação e produção desses fatores contráteis e relaxantes são equilibradas para promover a manutenção do tônus vascular. Entretanto, em

condições patológicas como obesidade, hiperglicemia e nos distúrbios causados pelo DM, ocorre um desequilíbrio entre estes fatores e uma consequente diminuição da vasodilatação endotélio-dependente que pode resultar no processo de disfunção endotelial (CARVALHO et al., 2001; MA et al., 2010; SZASZ & WEBB, 2012).

Os mecanismos pelos quais o DM contribui para a disfunção endotelial ainda não estão bem elucidados, entretanto, já foi comprovado que a hiperglicemia leva a maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células endoteliais aórticas humanas (COSSENTINO et al., 1997) e níveis circulantes elevados de endotelina-1 e moléculas de adesão celular 1 (ICAM-1). O aumento de EROs altera a função da eNOS, comprometendo a ação vasodilatadora do endotélio (FORSTERMANN & MUNZEL, 2006).

Estudos como o de Barma e colaboradores (2009), utilizando modelo animal, demonstraram que os altos níveis de TNF α ativam o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), levando a uma série de alterações inflamatórias no tecido vascular como, por exemplo, o aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais e do músculo liso vascular, possibilitando um aumento do infiltrado de células inflamatórias, mantendo, assim, o estado inflamatório. Essas alterações resultam em ativação endotelial que contribui para o desenvolvimento de disfunção endotelial.

O processo inflamatório é uma reação de defesa do organismo muito complexa, no qual diferentes marcadores parecem desempenhar vários papéis e seguir múltiplos caminhos metabólicos. Entre os diversos marcadores associados com a inflamação estão as citocinas pró-inflamatórias; citocinas anti-inflamatórias; quimiocinas; marcadores de consequência da inflamação, entre outros (WU & WU, 2006).

O TNF- α , citocina pró-inflamatória, apresenta papel importante na fisiopatologia da resistência à insulina e, conseqüentemente, com a etiologia do DM, uma vez que promove uma diminuição da expressão dos transportadores de glicose (GLUT-4) na superfície celular, fosforilação do substrato 1 dos receptores de insulina (IRS-1) e fosforilação específica da insulina (ARSLAN et al., 2010).

Estudo realizado por Bradley e colaboradores (2008) demonstrou que animais submetidos a tratamento contínuo com dieta hiperlipídica possuem aumento da expressão de TNF- α no tecido adiposo, além de outros fatores que caracterizam o

processo inflamatório. A indução do processo inflamatório está associada a aumentos concomitantes nos níveis de insulina, leptina e glicose, reforçando a relação do processo inflamatório crônico com a resistência insulínica.

Além do TNF α , os Lipossacarídeos (LPS), interferon gama e interleucina tipo 1 (IL-1), entre outros, apresentam ação pró-inflamatória e são ativados através do processo inflamatório (MANTOVANI et al., 2009). Essa resposta está relacionada a cascata inflamatória Th1 e as principais substâncias produzidas são as interleucina do tipo 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e TNF- α (ITALIANI & BORASCHI, 2015).

A padronização de modelos de diabetes em animais é possível devido às semelhanças genômicas e bioquímicas entre humanos e ratos. Essas semelhanças, decorrentes do processo evolutivo, fornecem uma forma de propor intervenções e testes de tratamento a partir do pressuposto de que as manifestações clínicas observadas no animal são também as observadas no ser humano (DHURIA et al., 2015; SINGH & PATHAK, 2015).

Nos modelos animais disponíveis para DM2, nem todos refletem um modelo de indução confiável para a pesquisa de repercussões vasculares, especialmente devido às características multifatoriais do DM2. Esse fator torna a avaliação da progressão cronológica de mudanças bioquímicas e funcionais semelhantes muito desafiadora, notadamente quando comparada com a que ocorre em humanos (DHURIA et al., 2015).

A elucidação de novas terapias ou mecanismos farmacológicos relacionados à doença pode contribuir para a redução de eventos cardiovasculares. Os dados de DM2 em modelos animais são relevantes e são uma fonte de compreensão da patogênese e progressão da doença, sendo amplamente utilizados na busca de soluções relacionadas à prevenção, diagnóstico e elucidação de novos tratamentos (KATSUDA et al., 2013).

Nesse contexto, o DM2 com seus elevados índices de morbimortalidade mundial leva à necessidade de evidências de alta qualidade sobre os processos oxidativos e inflamatórios relacionados às manifestações vasculares. Assim, este estudo tem como objetivo realizar uma revisão sistemática baseada em dados de fontes primárias cuidadosamente selecionadas na literatura para determinar os modelos animais mais adequados para DM2.

2.4.3 METODOLOGIA

Os autores seguiram o protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*) para a realização deste estudo, conforme descrito por Moher e colaboradores (2009).

Critério de seleção

Foram selecionados estudos que atendessem aos seguintes critérios: (I) avaliação da disfunção vascular (II) estudo experimental em ratos (III) modelo de indução de DM2 (IV) parâmetros laboratoriais utilizados para diagnosticar DM2 em modelo animal e (V) aspectos éticos respeitados em estudos com animais.

Estratégias de Pesquisa

Dois pesquisadores calibrados realizaram uma busca sistemática em diversas bases de dados médicas e científicas (GOOGLE SCHOLAR, MEDLINE - National Library of Medicine, SCIENCE DIRECT e WEB OF SCIENCE) usando a combinação dos seguintes descritores: "Modelo animal", "Diabetes Tipo 2", "Disfunção endotelial" e "Artéria aorta". A busca foi realizada para artigos publicados antes de 20 de junho de 2020. Não houve restrição de idioma na busca sistemática e as referências dos estudos foram analisadas para identificar possíveis estudos adicionais.

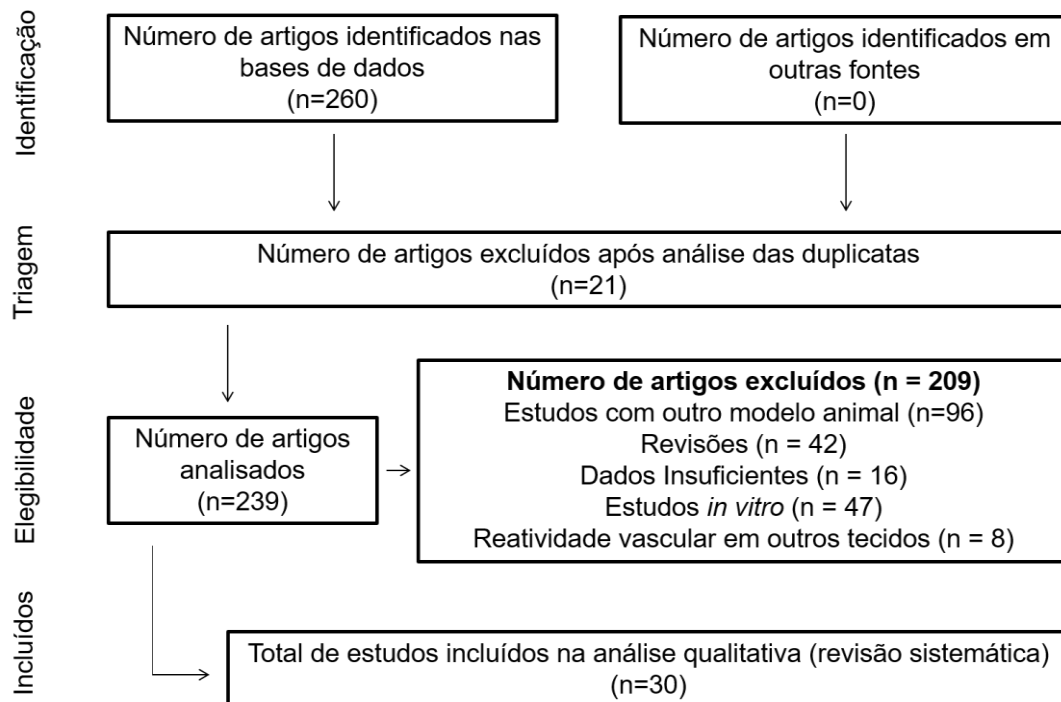
Extração de dados

Os dados foram extraídos de artigos cujo desfecho primário foi o comprometimento da função endotelial em animais com DM2 e cujas características se assemelhassem à disfunção endotelial em pacientes diabéticos. Como desfecho secundário, metodologias com foco na função vasodilatadora do endotélio foram analisadas para caracterizar o quadro de disfunção endotelial. Dois pesquisadores independentes realizaram a extração de dados em um formulário padronizado.

2.4.4 REULTADOS

Ao final da estratégia de busca, 30 artigos foram incluídos na análise e compuseram a presente revisão (Figura 12). Os estudos selecionados foram publicados entre 2005 e 2020 e abrangeram diversos países dos Continentes Europeu, Americano e Asiático. Foi observado diferentes metodologias entre os estudos sobre como avaliar a função vascular, entretanto, todos apresentavam protocolos de reatividade vascular para avaliação da função endotelial (Quadro 7). Os dados numéricos foram extraídos e analisados.

Figura 12 - Diagrama PRISMA mostrando o método de seleção de elegibilidade dos artigos incluídos no estudo.



Quadro 7 - Descrição sumária dos estudos incluídos na revisão sistemática

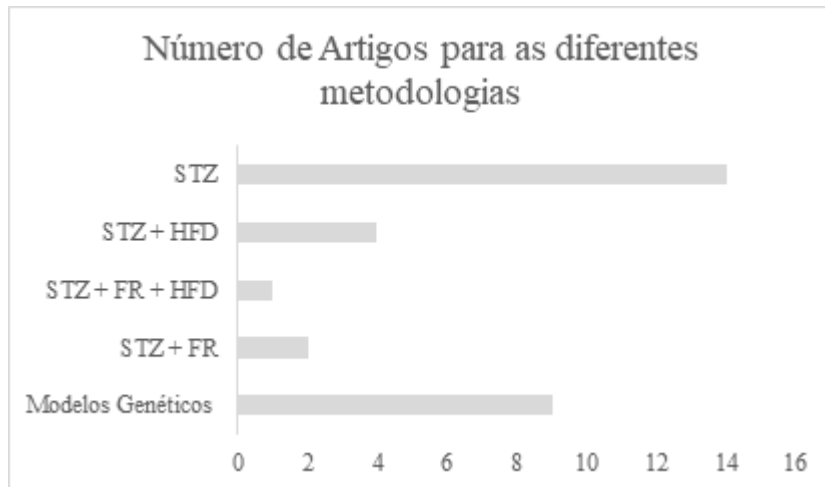
Autor, Ano	Animal, Gênero	Modelo de indução	Modelo de avaliação vascular	Foco do estudo
Ahn, 2005	Sprague–Dawley, ♂	STZ (55 mg/kg - ip)	Reatividade vascular	Avaliar a função endotelial pela resposta vasodilatadora na aorta torácica de ratos DM2
Anbar, 2016	Sprague–Dawley, ♂	STZ (50 mg/kg - ip)	Reatividade vascular	Investigar disfunção vascular usando STZ em modelo de DM2 em ratos
Bitar, 2005	Goto-Kakizaki / wistar, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular dosagem de eNOS e nitrito	Avaliar disfunção vascular em modelos geneticamente diabéticos
Caiyan Liu, 2015	Sprague–Dawley, ♂	STZ (30 mg/kg - ip) + DH por 8 semanas	Reatividade vascular, dosagem NO, eNOS e citocinas	Avaliar disfunção endotelial em modelos de ratos DM2 induzido por DH + STZ
Cano, 2019	Zucker fatty, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular, dosagem de proteínas e citocinas	Relação da disfunção endotelial com obesidade, resistência insulínica e hiperglicemia
Elçioğlu, 2010	Wistar, ♂	STZ (60 mg/kg - ip) + frutose por 8 semanas	Reatividade vascular	Comparar a influência da hiperglicemia na contratilidade da aorta de ratos DM1 e DM2
Halvorson, 2019	Goto-Kakizaki/wistar, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular	Avaliar disfunção endotelial e tonos vascular em ratos GK
Kunasegaran, 2017	Sprague–Dawley, ♂	STZ (30 mg/kg - i.p) + frutose por 3 semanas	Reatividade vascular e dosagem de superóxido, nitrato, nitrito e NO	Avaliar os efeitos e mecanismos da reatividade vascular de aortas de ratos induzidos com Frutose + STZ
Kazuyama, 2009	Goto-Kakizaki / wistar, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular e dosagem de eNOS, iNOS, NO ₂ e NO ₃	Avaliar disfunção endotelial em modelos de DM2
Liu, 2015	Sprague–Dawley, ♂	STZ (35 mg/kg - i.p) + DH por 4 semanas	Reatividade vascular	Avaliar a disfunção endotelial em ratos DM2
Malakul, 2011	Sprague-Dawley, ♂	STZ (55 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular e dosagem de NO ₂ e superóxido	Investigar a função endotelial e estresse oxidativo vascular na aorta de ratos DM2
Mohebbati, 2018	Wistar, ♂	STZ (60 mg/kg -ip)	Reatividade vascular	Investigar reatividade aórtica para agentes vasodilatadores e vasodilatadores em ratos diabéticos-STZ
Olukman, 2010	Wistar, ♂	STZ (55 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular	Avaliar disfunção endotelial e expressão de isoformas de NOS na aorta ratos DM2
Paavonen, 2010	Sprague-Dawley, ♂	STZ (50 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular, dosagem de superóxido, NO e NOS	Investigar os mecanismos de disfunção vascular mediados por AGE, pela redução da viabilidade e resistência de NO
Pereira, 2017	Goto-Kakizaki / wistar, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular e estresse oxidativo na parede vascular	Avaliar disfunção endotelial em ratos DM2
Rahma, 2018	- ♂	STZ (60 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular	Avaliar disfunção endotelial em ratos DM2
Román, 2020	Sprague–Dawley, ♂	STZ (65 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular	Determinar a Reatividade vascular em ratos diabéticos induzidos por STZ
Sena, 2009	Goto-Kakizaki / Wistar, ♂	Modelo genético + DH	Reatividade vascular, estresse oxidativo e metabólico	Avaliar disfunção endotelial e estresse oxidativo em ratos Goto-Kakizaki alimentados com uma dieta hiperlipídica

Sena, 2011	Goto-Kakizaki / Wistar, ♂	Modelo genético + DH	Reatividade vascular, estresse oxidativo e metabólico, dosagem de nitrito	Avaliar disfunção endotelial, estresse oxidativo e inflamação primária em ratos Goto-Kakizaki alimentados com uma dieta hiperlipídica
Sena, 2012	Goto-Kakizaki / Wistar, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular, estresse oxidativo e metabólico, dosagem de NO e histologia	Avaliar disfunção endotelial, estresse oxidativo e inflamação em ratos Goto-Kakizaki
Sleem, 2014	Wistar, ♂	STZ (60 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular, dosagem de NO e eNOS, e Histologia	Avaliar disfunção endotelial em ratos DM2 e os possíveis mecanismos envolvidos
Schafer, 2007	Wistar, ♂	STZ (50mg/kg - ip)	Reatividade vascular e dosagem de superóxidos	Avaliar função endotelial e ativação plaquetária em ratos DM2
Sturza, 2019	Wistar, ♂	STZ (50mg/kg - ip)	Reatividade vascular, dosagem de EROS e expressão de MAO	Avaliar a função endotelial em ratos com DM2
Vella, 2017	Wistar, ♂	STZ (65mg/kg - ip)	Reatividade vascular, função ventricular e eletrofisiologia	Avaliar disfunção cardiovascular em diabetes induzidos por STZ
Wang, 2009	Wistar, ♂	STZ (30 mg/kg - i.p) + DH por 4 semanas	Reatividade vascular e dosagem de NO e proteínas	Avaliar a disfunção endotelial e biodisponibilidade de NO em ratos com DM2
Woodman, 2009	Sprague - Dawley, ♂	STZ (55 mg/kg - i.p)	Reatividade vascular e dosagem de O ₂ na aorta	Avaliar função endotelial e estresse oxidativo em aortas de ratos DM2
Yi, 2012	Wistar, ♂	STZ (30mg/kg - i.p)	Reatividade vascular	Avaliar função endotelial em aortas de ratos DM2
Zakaria, 2016	Sprague-Dawley, ♂	STZ (35mg/kg - i.p) + Frutose + DH	Reatividade vascular e histologia	Avaliar a disfunção cardíaca, isquemia miocárdica, pressão arterial, fibrose cardiovascular, inflamação sistêmica e estresse oxidativo em ratos DM2
Zhong, 2011	Goto-Kakizaki / Wistar, ♂	Modelo genético	Reatividade vascular, dosagem de NO e EROs	Comparar a função vascular em ratos diabéticos magros (GK) e obesos (OLETF) em diferentes estágios
Zhu, 2014	Wistar, ♂	STZ (30mg/kg - i.p) + DH	Reatividade vascular, dosagem de eNOS e NO, e histopatologia	Avaliar a resposta vasodilatadora na aorta de ratos DM2 induzidos por STZ +DH

Extração de dados referentes aos modelos diabéticos, animais utilizados, disfunção vascular em ratos diabéticos avaliados por diferentes protocolos experimentais e o foco de cada estudo. Abreviações: DM1 (Diabetes tipo 1), DM2 (Diabetes tipo 2), STZ (estreptozotocina), i.p. (intraperitoneal), DH (Dieta hiperlipídica), NO (Óxido nítrico), eNOS (Óxido nítrico sintase endotelial), iNOS (Óxido nítrico sintase induzida), NO₂ (nitrito), NO₃ (nitrato), AGE (Produtos avançados de glicação), GK (ratos Goto-Kakizaki)

A partir da compilação dos dados, observou-se que o interesse na área experimental relacionado ao desenvolvimento do DM2 vem aumentando, bem como a investigação do comprometimento da função vascular em tais modelos. A figura 13 mostra a distribuição do número de artigos com os diversos modelos experimentais encontrados na literatura que avaliaram a disfunção endotelial em modelos de DM2 por meio de técnicas de reatividade vascular. O modelo mais utilizado de indução de DM2 é por estreptozotocina, seguido pelos modelos genéticos.

Figura 13 - Frequência de artigos (2005-2020) avaliando métodos de indução de DM2 e comprometimento vascular em modelos animais.



Uma tendência ascendente de publicações envolvendo diabetes experimental foi observada ao longo dos anos de observação (dados não mostrados). Modelos Experimentais de Diabetes: STZ+FR (Indução de DM2 por baixa dose de estreptozotocina associada à administração oral de frutose); STZ+DH+FR (Indução de DM2 por baixa dose de estreptozotocina associada a dieta hiperlipídica e administração oral de frutose); STZ+DH (indução de DM2 por baixa dose de estreptozotocina associada a dieta hiperlipídica); e STZ (indução de DM2 por alta dose de estreptozotocina).

Os dados de reatividade vascular avaliando a resposta vasodilatadora para a acetilcolina (Ach) e vasoconstritora para fenilefrina (Phe) em aorta de ratos diabéticos foram extraídos dos artigos e tabulados (Tabelas 6, 7 e 8). Após a análise dos dados, além dos animais naturalmente diabéticos (grupo do modelo genético), um total de quatro protocolos experimentais sugerem o desenvolvimento do DM2 com comprometimento vascular. Entre eles a indução por baixa dose de STZ associada a administração oral de frutose, baixa dose de STZ associada à DH, baixa dose de STZ associada a administração oral de frutose e DH e por alta dose de STZ (Tabela 8).

Tabela 6: Função vascular em DM2 induzido por baixa dose de STZ associado a administração oral de frutose, dieta hiperlipídica (DH) ou ambos

DM2 INDUZIDO POR BAIXA DOSE DE STZ (30 mg/kg) ASSOCIADO A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE FRUTOSE							
Autor, Ano	Número amostral		Vasodilatação - Ach Emax (%)		Vasoconstrição - Phe Emax (%)		Influência do modelo de DM2 na resposta para Ach e Phe
	Normo	Hiper	Normo	Hiper	Normo	Hiper	
Kunasegaran, 2017	6	6	92,8±1,3	46,17±1,37	174,7±2,6	198,8±1,2	Redução de 50,25% na resposta vasodilatadora e aumento de 13,8% na resposta vasoconstritora
Elçioğlu, 2010	6	6	87,9±2,3	48,42±1,8	138,77±3	89,84±3,7	Redução de 44,9% na resposta vasodilatadora e Redução de 35,2% na resposta vasoconstritora
DM2 INDUZIDO POR BAIXA DOSE DE STZ (30-35 mg/kg) ASSOCIADO A DH							
Autor, Ano	Número amostral		Vasodilatação - Ach Emax (%)		Vasoconstrição - Phe Emax (%)		Influência do modelo de DM2 na resposta para Ach e Phe
	Normo	Hiper	Normo	Hiper	Normo	Hiper	
Caiyan, 2015	6	8	90,2±0,9	43,1±2,3	NR	NR	Redução de 52,2% na resposta vasodilatadora
Liu, 2015	7	7	98,5±1	59,5±3,2	NR	NR	Redução de 39,3% na resposta vasodilatadora
Wang, 2009	8	8	83,3±2	60,59±3,8	NR	NR	Redução de 27,3% na resposta vasodilatadora
Zhu, 2014	10	10	85,8±2	35,6±7	NR	NR	Redução de 58,5% na resposta vasodilatadora
DM2 INDUZIDO POR BAIXA DOSE DE STZ (30-35 mg/kg) ASSOCIADO A FRUTOSE E DH							
Autor, Ano	Número amostral		Vasodilatação - Ach Emax (%)		Vasoconstrição - Phe Emax (%)		Influência do modelo de DM2 na resposta para Ach e Phe
	Normo	Hiper	Normo	Hiper	Normo	Hiper	
Zakaria, 2016	10	10	NR	NR	259,5±2	377,4±7	Aumento de 45,4% na resposta vasoconstritora

Extração de dados da resposta vasodilatadora e vasoconstritora máxima (Emax) no Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) induzido por baixa dose de estreptozotocina mais administração oral de frutose, DH ou ambos. As respostas vasodilatadora e vasoconstritora estão representadas como média ± EPM. Abreviações: Ach (acetilcolina), Phe (fenilefrina), Normo (normoglicêmico), Hiper (hiperglicêmico), NR = não realizado.

Tabela 7: Função vascular em DM2 de animais geneticamente modificados

Autor, Ano	Número amostral		Vasodilatação - Ach Emax (%)		Vasoconstrição - Phe Emax (%)		Influência do modelo de DM2 na resposta para Ach e Phe
	Normo	Hiper	Normo	Hiper	Normo	Hiper	
Bitar, 2005	8	8	93±7	68,5±6	NR	NR	Redução de 26,3% na resposta vasodilatadora
Cano, 2019	6	6	52,4±7	53,8±8	88,2±3	88,2±3	Não houve diferença estatística
Halvorson 2019	6	6	NR	NR	41.2±0.3	43.5±0.3	Não houve diferença estatística
Kazuyama, 2009	6	8	50,3±2,3	39,74±4,5	NR	NR	Redução de 21,5% na resposta vasodilatadora
Pereira, 2017	8	8	86,5±3,8	50,7±3,7	NR	NR	Redução de 27,17% na resposta vasodilatadora
Sena, 2009	12	16	99,1±1,3	72,9±1,3	NR	NR	Redução de 26,4% na resposta vasodilatadora
Sena, 2011	16	16	98,9±4,8	72±2,1	NR	NR	Redução de 27,2% na resposta vasodilatadora
Sena, 2012	16	16	98,9±4,8	72±2,1	NR	NR	Redução de 27,2% na resposta vasodilatadora
Zhong, 2011	8	8	82,6±4,2	92,3±3,2	NR	NR	Aumento de 11,78% na resposta vasodilatadora

Extração de dados da resposta vasodilatadora e vasoconstritora máxima (Emax) no Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) em animais geneticamente modificados. As respostas vasodilatadora e vasoconstritora estão representadas como média ± EPM. Abreviações: Ach (acetilcolina), Phe (fenilefrina), Normo (normoglicêmico), Hiper (hiperglicêmico), NR = não realizado.

Tabela 8 - Função vascular em DM2 induzido por alta dose of STZ (50-65 mg/kg)

Autor, Ano	Número amostral		Vasodilatação - Ach Emax (%)		Vasoconstrição - Phe Emax (%)		Influência do modelo de DM2 na resposta para Ach e Phe
	Normo	Hiper	Normo	Hiper	Normo	Hiper	
Ahn, 2005	15	15	74,5±2,6	70,1±3,1	NR	NR	Redução de 5,9% na resposta vasodilatadora
Anbar, 2016	6	5	NR	NR	453,9±0,1	625,6±32	Aumento de 37,8% na resposta vasoconstritora
Malakul, 2011	8	8	87±7	61±8	NR	NR	Redução de 29,9% na resposta vasodilatadora
							Redução de 12,85% na resposta vasodilatadora

Mohebbati 2018	10	10	70±4	40±6	80±7	118±5	e aumento de 32,2% na resposta vasoconstritora
Olukman, 2010	12	12	93,6±1,6	85,4±2,4	1065±3,2	1273±1,3	Redução de 8,89% na resposta vasodilatadora e aumento de 19,53% na resposta vasoconstritora
Paavone m, 2010	5	5	75,6±2,7	79±1,6	NR	NR	Aumento de 4,5% na resposta vasodilatadora
Rahma, 2018	8	8	95±3	65±2	NR	NR	Aumento de 31,5% na resposta vasodilatadora
Román, 2020	20	20	80,7±4,3	64±3	68,2±10	78,5±7	Redução de 20,69% na resposta vasodilatadora
Schafer, 2007	10	10	85±7	100±3	NR	NR	Aumento de 17,6% na resposta vasodilatadora
Sleem, 2014	5	5	89,16±3	42,65±2,5	NR	NR	Redução de 52,16% na resposta vasodilatadora
Sturza, 2019	10	10	99±2	80±3	65±7	92±6	Redução de 19,19% na resposta vasodilatadora e aumento de 41,53% na resposta vasoconstritora
Vella, 2017	20	20	96±2	83±4	NR	NR	Redução de 13,5% na resposta vasodilatadora
Woodman 2009	15	14	78±2	66±3	NR	NR	Redução de 15,4% na resposta vasodilatadora
Yi, 2012	8	8	93,9±2	67,6±7	NR	NR	Redução de 28,01% na resposta vasodilatadora

Extração de dados da resposta vasodilatadora e vasoconstritora máxima (Emax) no Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) induzido por alta dose de estreptozotocina (50-65 mg/kg). As respostas vasodilatadora e vasoconstritora estão representadas como média ± EPM. Abreviações: Ach (acetilcolina), Phe (fenilefrina), Normo (normoglicêmico), Hiper (hiperglicêmico), NR = não realizado.

Entre os estudos analisados, os modelos de indução por baixa dose de STZ mais administração oral de frutose ou DH apresentaram a maior e mais uniforme porcentagem de redução na resposta de vasodilatação: 47,57% ± 3,8 (n=33) e 44,4% ± 13,8 (n=12), respectivamente, quando comparados aos animais não diabéticos.

O modelo geneticamente modificado (Tabela 6) apresentou redução média de 24,4% ± 3,89 (n=92) na vasodilatação, enquanto o modelo de indução induzida por alta dose de STZ (Tabela 7) apresentou redução média de 23,37% ± 17,15 (n=150).

Além de exibirem um menor percentual de redução, apresentaram dados discrepantes com percentuais de redução diferentes e conflitantes.

Autores como Paavonem e colaboradores (2010), Schafer e colaboradores (2007) e Zhong e colaboradores (2011) demonstraram que animais diabéticos apresentaram maior resposta vasodilatadora que animais controles. Já estudos realizados por Cano e colaboradores (2019) e Halvorson e colaboradores (2019) não observaram diferenças significativas na resposta vasodilatadora em animais diabéticos e não diabéticos, o que se contrapõe à maioria dos achados descritos na literatura.

Devido ao limitado número de artigos que analisaram o comprometimento da resposta vasoconstritora à fenilefrina, não foi possível considerar tal parâmetro como indicativo do modelo de DM e relacioná-lo ao observado em pacientes com DM2.

Uma outra metodologia realizada nos estudos incluídos nesta revisão foi a avaliação da viabilidade do endotélio vascular por meio da biodisponibilidade de NO e seus derivados. Os dados extraídos indicam diminuição dos níveis de NO em todos os protocolos de indução de diabetes. Porém, essa diminuição foi mais expressiva no modelo que utilizou dose baixa de STZ associada a DH (Tabela 9), com redução média de $71,24\% \pm 10,64$. No modelo de DM2 induzido por alta dose de STZ, a redução dos níveis de NO foi de $51,65\% \pm 11,31$ e nos modelos genéticos de $35,65\% \pm 6,34$.

Tabela 9 - Função vascular de animais diabéticos avaliados pela mudança nas concentrações de óxido nítrico aórtico

	Autor, Ano	Número amostral		Biodisponibilidade de NO		Perfil da biodisponibilidade de NO em animais diabéticos comparado ao controle
		Normo	Hiper	Normo	Hiper	
DM2: Modelo Genético	Bitar, 2005	8	8	8,5±0.4	4,9±0,2	Redução de 42,35% na biodisponibilidade de NO (nmol/mg)
	Halvorson 2019	6	6	132±18	96±14	Redução de 27,27% na biodisponibilidade de NO (nmol/g)
	Pereira, 2017	8	8	0,96±0,6	0,56±0,4	Redução de 41,66% na biodisponibilidade de NO (pVASP/VASP)
	Sena, 2011	16	16	1,0±0,1	0,67±0,05	Redução de 33% na biodisponibilidade de NO (pVASP/VASP)
	Sena, 2012	16	16	1,0±0,07	0,66±0,03	Redução de 34% na biodisponibilidade de NO (pVASP/VASP)
DM2: Alta dose de STZ	Malakul, 2011	8	8	100±0,3	60±0,1	Redução de 40% na biodisponibilidade de NO (nmol/g)
	Sleem, 2014	5	5	80,2±0,1	30±0,1	Redução de 62,6% na biodisponibilidade de NO (µmol/g)
	Vella, 2017	20	20	6,1±0,5	2,9±0,2	Redução de 52,45% na biodisponibilidade de NO (µmol/g)
DM2: Baixa dose de STZ	Caiyan Liu, 2015	6	8	210±40	45±5	Redução de 63,16% na biodisponibilidade de NO (µmol/g)
	Wang, 2009	8	8	27±2	11±3	Redução de 78,57% na biodisponibilidade de NO (µmol/g)
	Zhu, 2014	10	10	3,8±5	1,4±3	Redução de 58,14% na biodisponibilidade de NO (µmol/g)

Extração dos dados de biodisponibilidade do NO nos diferentes modelos de Diabetes Type 2. Os níveis de Óxido Nítrico estão representados como média ± EPM. Abreviações: STZ (estreptozotocina), DH (Dieta hiperlipídica), VASP (Vasodilatação estimulada por fosfoproteína), Normo (Normoglicêmico), Hiper (Hiper-glicêmico).

2.4.5 DICUSSÃO

Até onde sabemos, esta é a primeira revisão sistemática que enfoca na investigação de protocolos experimentais que apresentem padrões de comprometimento da vasodilatação e aumento da vasoconstrição associados alterações de vias que se assemelham aos pacientes diabéticos. A maior parte dos estudos incluídos foi publicada em 2009 (n=6) conforme mostra a tabela 1.

O DM experimental tem sido amplamente investigado nos últimos anos, porém a variabilidade dos protocolos de indução e a complexidade dos fatores envolvidos nas condições diabéticas dificultam a determinação de um modelo diabético experimental com as características metabólicas de pacientes com DM2 (JELINIC et al., 2020). Em humanos, o DM2 é caracterizado por várias alterações metabólicas, como resistência à insulina, hiperglicemia, obesidade visceral e dislipidemia. Esses fatores podem interromper a homeostase vascular, afetando assim o endotélio e promovendo a disfunção vascular (RAJENDRAN et al., 2013).

Já está bem estabelecido na literatura que o DM é uma doença progressiva complexa, caracterizada por hiperglicemia crônica e dislipidemia associada à disfunção endotelial (SHAMSALDEEN et al., 2018). Entre os vários fatores envolvidos nesta disfunção está o desequilíbrio entre os mediadores vasoconstritores e vasodilatadores do endotélio (CASSUTO et al., 2014). No entanto, em relação ao DM2 experimental, vários estudos mostraram resultados contraditórios relacionados à resposta vascular (AHN et al., 2005; CANO et al., 2019; HALVORSON et al., 2019), que podem levar a dados diversos que não avaliam, de fato, o quadro disfuncional observado no DM2.

De acordo com os resultados, os modelos que utilizam baixas doses de STZ mais se assemelham ao descrito nos dados de disfunção vascular em pacientes diabéticos, uma vez que foi demonstrado que a resposta vasodilatadora diminuiu significativamente nesses modelos. Esse resultado é corroborado por diferentes estudos que utilizaram uma dose baixa de STZ para indução do DM2 (Tabelas 6 e 7). Além disso, o comprometimento da resposta vasodilatadora foi maior no modelo diabético induzido por STZ em dose baixa mais tratamento oral com frutose ou DH (CAIYAN et al., 2015; KUNASEGARAN et al., 2017) quando comparado com o modelo

diabético induzido por dose alta STZ ou geneticamente modificado (SENA et al., 2012; MALAKUL et al., 2011).

STZ é uma substância derivada da espécie *Streptomyces achromogenes*, desenvolvida para ação antibiótica. No entanto, devido à sua semelhança com a glicose, é capturada pela célula β -pancreática por meio do transportador de glicose (ELSNER; GULDBAKKE; TIEDGE, 2000). Após entrar nessas células, promove citotoxicidade pela estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio, destruição e depleção do estoque de energia celular, resultando em necrose das células β -pancreáticas, modelo que pretende mimetizar o que acontece no DM1 (MACHADO, ORTOLAN & SPADELLA, 2009; LENZEN, 2008).

Acredita-se que concentrações reduzidas de STZ promovam menores danos às células β -pancreáticas, com ligeira variação nos níveis de insulina. Em resposta, o organismo começa a expressar condição semelhante à resistência e diminuição da sensibilidade à insulina observada no DM2. Por conta disso, existe a preocupação com estratégias de associação com frutose e DH para promover o desenvolvimento de uma resistência significativa (SRINIVASAN et al., 2005).

Além disso, o uso de altas doses de STZ para indução de DM2 pode ser extremamente tóxico para o modelo animal, desencadeando condições diabéticas graves. Demonstramos que um modelo que usa alta dose de STZ produz disfunção endotelial errática e não homogênea, portanto, não configuram um método robusto para concluir sobre o efeito de substâncias nessa condição (Tabela 7).

Por esse motivo, modelos experimentais que usam doses menores de STZ suplementados com frutose ou DH são cada vez mais utilizados. O NO e outros mediadores, como a prostaciclina, encontram-se alterados em vasos sob influência do DM2 (SENA, PEREIRA & SEIÇA, 2013; WANG, CHARUKESHI & JOHN 2014), levando a uma diminuição da vasodilatação por conta do aumento da expressão de fatores contráteis derivados do endotélio associados à ação de mediadores como a proteína quinase C, não-glicação enzimática e estresse oxidativo que promovem a fisiopatologia do dano vascular no DM (DE VRIESE et al., 2000).

Em estudo realizado por Panchal e Brown (2011), os autores demonstraram que os modelos diabéticos por DH são mais representativos clinicamente, sendo que esses animais apresentam aumento da taxa de tecido adiposo branco. Por outro lado, o tratamento com frutose oral pode estar relacionado à desregulação na produção de

insulina, leptina e grelina, o que leva ao aumento da ingestão calórica e contribui para ganho de peso e obesidade (TEFF et al., 2004). Em ambas as situações, pode ocorrer aumento na ativação de vias pró-inflamatórias, resultando em disfunção endotelial.

Ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo genético para DM2 obtido do cruzamento de ratos Wistar com altos níveis glicêmicos, são animais não obesos com hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia e intolerância à glicose, com várias complicações diabéticas (PORTHA et al., 2001). De acordo com Srinivasan e Ramarao (2007), esses animais são considerados um dos melhores modelos para o estudo do DM2, o que contrasta com os resultados que encontramos nesta revisão sistemática.

Foi demonstrado nesta revisão (Quadro 6) que diferentes autores relataram aumento e diminuição da resposta vascular nas mesmas condições, o que explica o elevado desvio padrão encontrado na análise dos dados de resposta vasodilatadora e vasoconstritora no modelo diabético geneticamente modificado. Além desses resultados conflitantes, observamos que a redução da resposta vasodilatadora não foi significativa no modelo genético.

O desenvolvimento de disfunção endotelial no tecido aórtico pode estar associado a fatores como aumento de superóxidos e desregulação da ação e síntese de óxido nítrico (BITAR et al., 2005). O número de artigos selecionados neste estudo que mediram NO foi reduzido. Porém, assim como os resultados encontrados pela avaliação da reatividade vascular, o modelo que utilizou baixa dose de STZ associada à DH apresentou redução mais expressiva nas quantidades de NO (Tabela 9).

O NO é um potente vasodilatador derivado do endotélio vascular e, segundo Malakul e colaboradores (2011), a redução do NO em condições patológicas como o DM2 é um indicador de disfunção endotelial. Portanto, a degradação oxidativa do NO pode ser um indicativo de comprometimento da resposta vasodilatadora à acetilcolina na aorta de ratos diabéticos (BITAR et al., 2005). Esses resultados corroboram os dados apresentados nas tabelas 6, 7 e 8 e demonstram que os dois parâmetros de disfunção vascular analisados neste estudo, apontaram que o DM2 induzido por baixa dose de STZ + DH causa maior disfunção vascular.

Embora esta revisão sistemática traga dados relevantes sobre o comprometimento da resposta vascular nos modelos atuais de DM2 em ratos e mostre

informações contraditórias nos estudos incluídos, algumas limitações devem ser apontadas e discutidas:

Houve um aumento de aspectos de heterogeneidade nos resultados extraídos dos estudos incluídos, cujos estudos utilizando os mesmos métodos de indução do DM2 trouxeram achados altamente contraditórios. A possível explicação para esses resultados são a linhagem distinta dos ratos utilizados nos estudos (Wistar, Sprague-Dawley) e o aumento da variação nas concentrações de STZ utilizadas para indução. Para os modelos genéticos, a relação estendida entre os genes silenciados mais do que outros também é uma fonte de viés que não pôde ser avaliada em nossos estudos.

Outro ponto é referente aos nossos resultados incluírem dados apenas para avaliação da disfunção vascular na aorta. Os estudos disponíveis na literatura focam na avaliação de artérias de condutância e vasos de resistência da circulação mesentérica, que limitam nossos dados sobre aorta, por exemplo. A falta de uma medida completa para as citocinas pró-inflamatórias que influenciam a disfunção vascular não permitiu uma avaliação do impacto desses mediadores nos resultados.

Por conta disso, a grande variação dos resultados inviabilizou a realização de uma metanálise para quantificar o impacto dos modelos de indução do DM2 e da disfunção vascular, o que possivelmente traria um maior nível de evidência científica para os resultados apresentados.

2.4.6 CONCLUSÕES

Ao revisar estudos experimentais abrangendo os diferentes modelos de protocolos de indução de DM2, foi possível observar que o uso de estreptozotocina em baixa dose associada a DH ou administração de frutose oral são modelos com maior concordância nos resultados e maior redução da resposta vasodilatadora, enquanto a resposta vascular a heterogeneidade de resultados encontrados nos modelos genéticos ou com uma alta dose de STZ não permitiu a análise estatísticas destes dados

Em conclusão, este estudo sugere que os modelos de DM2 induzidos por baixas doses de STZ em combinação com frutose oral ou DH são mais adequados para produzir mudanças uniformes e significativas na função endotelial. Assim, sua utilização em protocolos de investigação de doenças vasculares relacionadas ao DM2 pode ser capaz de produzir resultados de melhor qualidade e mais facilmente comparáveis a estudos de disfunção vascular em humanos.

2.4.7 REFERÊNCIAS

- AHN, G.J. et al. Chronic administration of phosphodiesterase 5 inhibitor improves erectile and endothelial function in a rat model of diabetes. **International journal of andrology**, v. 28, n. 5, p. 260-266, 2005.
- ANBAR, H.S. et al. Comparison of the effects of levocetirizine and losartan on diabetic nephropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **European journal of pharmacology**, v. 780, p. 82-92, 2016.
- ARSLAN, N.; ERDUR, B.; AYDIN A. Hormones and cytokines in childhood obesity. **Indian Pediatr.** v.47(10), p.829-39, 2010.
- BARMA, P. et al. Lipid induced overexpression of NF-kB in skeletal muscle cells in linked to insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1792, p.190-200, 2009.
- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.** v. 271, p1424-37, 1996.
- BITAR, M.S. et al. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. **European journal of pharmacology**, v. 511, n. 1, p. 53-64, 2005.
- BRADLEY, R.L.; JEON, J.Y.; LIU, F.F.; MARATOS-FLIER, E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2008.
- CAIYAN-LIU et al. Effect of 3, 4-dihydroxyacetophenone on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced rats with type 2 diabetes. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 22-27, 2015.
- CANO, D.M. et al. Elevated pulmonary arterial pressure in Zucker diabetic fatty rats. **Plos One.** v.14(1), p. e0211281, 2019.
- CARVALHO, M.H.C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev. Bras.Hipertens.** v.8(1), p. 76-88. 2001.
- CASSUTO, J. et al. Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients. **Diabetes.** v.63(4), p.1381-1393, 2014.
- CERAVOLO, G.S. et al. Papel dos principais componentes na gênese da hipertensão arterial: endotélio vascular. In: BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F. **Hipertensão.** 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap, 10, p. 79-89, 2012.
- COSENTINO, F. et al. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation.** v.96, p25-28, 1997.
- DASU, M.R.; JIALAL, I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via toll-like receptors. **Am. J. Pshysiol. Endocrinol. Metab.** v.300, p.145-154, 2010.
- DHURIA, Radhey S. et al. Current status and patent prospective of animal models in diabetic research. **Advanced biomedical research**, v. 4, 2015.

- DE VRIESE, A.S. et al. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br J Pharmacol.** v.130(5), p.963-974, 2000.
- ELÇIOĞLU, K.H. et al. Changes in caveolin-1 expression and vasoreactivity in the aorta and corpus cavernosum of fructose and streptozotocin-induced diabetic rats. **European journal of pharmacology**, v. 642, n. 1-3, p. 113-120, 2010.
- ELSNER, M.; GULDBAKKE, B.; TIEDGE M. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia.** v.43(12), p.1528-1533, 2000.
- FÖRSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation.** v.113, p.1708-14, 2006.
- FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers. Arch.** v.459(6), p. 923-39, 2010.
- FRANCIS, S.H. et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol. Ver.** v. 62(3), p.525-63, 2010.
- GALVÃO, A.L.B. et al. Importância da inflamação na hipertensão arterial: Revisão. **Nucleus Animalium**, v. 6, n. 1, p. 11, 2014.
- GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. **Cardiovasc. Research.** v.55, p.250-60, 2002.
- GRATTON, J.P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W.C. Caveolae and Caveolins in the Cardiovascular System. **Circulation Research.** v. 94, p.1408-1417, 2004.
- HALVORSON, B.D. et al. Endothelium-dependent impairments to cerebral vascular reactivity with type 2 diabetes mellitus in the Goto-Kakizaki rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.317(1), p. R149-R159, 2019.
- HO, F.M. et al. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3. **Circulation**, v. 101, n. 22, p. 2618-2624, 2000.
- HUANG, P.L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, 2009.
- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.** v. 41 (4), p. 485-490, 1992.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease, **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, p. 47, 2015.
- JELINIC, M. et al. The vascular consequences of metabolic syndrome: rodent models, endothelial dysfunction and current therapies. **Front Pharmacol.** v.11, p.148, 2020.
- KATSUDA, Y. et al. Diabetic mouse models. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 3, n. 04, p. 334, 2013.
- KATSUKI, S.A. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J. Cyclic. Nucleotide Res.** v.3, p.23-5, 1977.
- KAZUYAMA, E. et al. Endothelial dysfunction in the early-and late-stage type-2 diabetic Goto-Kakizaki rat aorta. **Mol Cell Biochem.** v.332(1-2), p.95-102, 2009.
- KUNASEGARAN, T. et al. Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats. **European journal of pharmacology**, v. 799, p. 160-170, 2017.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.
- LIRA NETO, J. Garcia, C. et al. Prevalência da Síndrome Metabólica em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, n. 2, 2017.
- LIU, S.Y. et al. Role of vascular peroxidase 1 in senescence of endothelial cells in diabetes rats. **International journal of cardiology**, v. 197, p. 182-191, 2015.
- MA, L. et al. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hypertens Res.** v.33 p.446-453, 2010.
- MACHADO, J.L.M.; ORTOLAN, É.V.P.; SPADELLA, C.T. Anastomotic healing in ileum and colon of alloxan-induced diabetic rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 24, n. 1, p. 57-61, 2009.

- MALAKUL, W. et al. Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 371-377, 2011.
- MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; LOCATI, M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis a question of balance. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 10, p. 1419-1423, 2009.
- MARCHINI, G.S. **Influência do cálculo ureteral silencioso sobre a função renal antes e após o tratamento**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015
- MERAJI, S. et al. Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. **Diabetes**. v. 36, n. 8, p. 978-981, 1987.
- MOHEBBATI, R.; PARICHEHR, H. Comparative effects of metformin and glibenclamide on aortic reactivity to vasodilator and vasoconstrictor agents in STZ-induced diabetic rats. **Iran J Pharm Sci**. v.14(4), p.33-44, 2018.
- MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Med**, v. 21, p. e100097, 2009.
- MOILANEN, E.; VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med**. v.27, p.359-67, 1995.
- MORAES, C. et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol**. v.8, p.12-7, 2008.
- OLUKMAN, M. et al. Apocynin restores endothelial dysfunction in streptozotocin diabetic rats through regulation of nitric oxide synthase and NADPH oxidase expressions. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 24, n. 6, p. 415-423, 2010.
- PAAVONEN, A.S. et al. Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase. **Journal of hypertension**, v. 28, n. 4, p. 780-788, 2010.
- PANCHAL, S.K.; BROWN, L. Rodent models for metabolic syndrome research. **J Biomed Biotech**. 2010; 2011.
- PEREIRA, R. A relação entre Dislipidemia e Diabetes Mellitus tipo 2. **Cadernos UniFOA**, v. 6, n. 17, p. 89-94, 2017.
- PORTHA, B. et al. beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. **Diabetes**, v. 50, n. suppl 1, p. S89, 2001.
- RAHMA, H.H.A.; ATTIA, A.A.S.A.; FADHEEL, S.M.A. The Protective Effect of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in STZ- Induced Diabetes Mellitus in Rats. **Ijppr Hum**. v.11(2), p.368-387, 2018.
- RAJENDRAN, P. et al. The vascular endothelium and human diseases. **Int J Biol Sci**. v.9(10), p.1057, 2013.
- ROMÁN, M. et al. Significant reduction of vascular reactivity with dantrolene and nimodipine in diabetic rats: a potential approach to cerebral vasospasm management in diabetes. **Pharmacol Rep**. v.72(1), p.126-134, 2020.
- RUDDY, J. et al. Differential effects of mechanical and biological stimuli on matrix metalloproteinase promoter activation in the thoracic aorta. **Circulation**, v. 120, n. 11_suppl_1, p. S262-S268, 2009.
- SZASZ, T.; WEBB, R.C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clin. Sci. (London)**. v.122, p.1-12, 2012.
- SCHÄFER, A. et al. Telmisartan improves vascular function and reduces platelet activation in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Pharmacological research**, v. 56, n. 3, p. 217-223, 2007.
- SENA, C.M. et al. Antioxidant and vascular effects of gliclazide in type 2 diabetic rats fed high-fat diet. 2009.
- SENA, C.M. et al. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 424-437, 2011.
- SENA, C.M. et al. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 5, p. 497-506, 2012.
- SENA, C.M.; PEREIRA, A.M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2216-2231, 2013.

- 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, p. e2995, 2018.
- SINGH, M.P.; PATHAK, K. Animal models for biological screening of anti-diabetic drugs: An overview. **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, n. 5, p. 37-48, 2015.
- SLEEM, M. et al. Combination therapy with losartan and l-carnitine protects against endothelial dysfunction of streptozotocin-induced diabetic rats. **European journal of pharmacology**, v. 744, p. 10-17, 2014.
- SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological research**, v. 52, n. 4, p. 313-320, 2005.
- SRINIVASAN, K. et al. Animal model in type 2 diabetes research: An overview. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 3, p. 451, 2007.
- STURZA, A. et al. Vitamin D improves vascular function and decreases monoamine oxidase A expression in experimental diabetes. **Mol Cell Biochem**. v.453(1-2), p.33-40, 2019.
- TEFF, K.L. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**. v.89(6), p.2963-2972, 2004.
- VAN DEN OEVER, I.A. et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. **Mediators. Inflamm.** p.792-393, 2010.
- VELLA, R.K.; DOUGLAS, J.J.; ANDREW, S.F. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol prevents cardiovascular dysfunction in STZ-diabetic Wistar-Kyoto rats. **BioMed Res Int**. 2017; 2017.
- WANG, C. et al. Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. **European journal of pharmacology**, v. 620, n. 1-3, p. 131-137, 2009.
- WANG, B.; CHARUKESHI C.P.; PIPPIN, J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 10, n. 2, p. 131-145, 2014.
- WELCH, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide and the cardiovascular system. **J. Cardiac. Surg.** v.9, p.361-71, 1994.
- WOODMAN, O.L.; MALAKUL, W. 3', 4'-Dihydroxyflavonol prevents diabetes-induced endothelial dysfunction in rat aorta. **Life sciences**, v. 85, n. 1-2, p. 54-59, 2009.
- World Health Organization: **World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs sustainable development goals**. World Health Organization, 2016.
- WU, J.T.; WU, L.L. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. **Clin. Chim. Acta.** v.366, p.74-80, 2006.
- YI, Q. et al. Protection of long-term treatment with huang-lian-jie-du-tang on vascular endothelium in rats with type 2 diabetes mellitus. **Current Therapeutic Research**, v. 73, n. 6, p. 174-185, 2012.
- ZAKARIA, E.M. et al. PARP-1 inhibition alleviates diabetic cardiac complications in experimental animals. **European journal of pharmacology**, v. 791, p. 444-454, 2016.
- ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P.M.; LEUNG, S.W.S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**. v. 129 (2), p.83-94, 2015.
- ZHONG, M.F. et al. Differential changes of aorta and carotid vasodilation in type 2 diabetic GK and OLETF rats: paradoxical roles of hyperglycemia and insulin. **Experimental diabetes research**, v. 2012, 2011.
- ZHU, K.X. et al. Ganoderma atrum polysaccharide improves aortic relaxation in diabetic rats via PI3K/Akt pathway. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 520-527, 2014.

3. JUSTIFICATIVA

O Diabetes mellitus está entre as desordens cardiometabólicas de maior interesse em pesquisas científicas que visam esclarecer os eventos patológicos e elucidar novas estratégias terapêuticas. É caracterizado como uma doença crônica degenerativa, causada por vários fatores predisponentes que produzem em longo prazo alterações macro e micro vasculares. Esses fatores estão associados, principalmente, a obesidade, excesso de peso e efeitos ambientais ou genéticos tanto no DM2, quanto no DMG.

A presença de quadro inflamatório de baixo grau presente no diabetes resulta na ativação do endotélio, levando à desregulação da função vascular e à disfunção endotelial. Nestas mesmas condições, observa-se desregulação da secreção das substâncias vasoativas derivadas do PVAT, as quais tem diminuída sua ação protetora na regulação do vaso, acentuando a disfunção vascular.

Várias vias metabólicas são ativadas no processo inflamatório, seja para estimular ou inibir as ações pró e anti-inflamatórias. O papel da via das quinureninas sobre a regulação da função vascular em situações patológicas ainda precisa ser melhor investigado. Não está claro como esta via interfere no processo de disfunção vascular associado à hiperglicemia observada no diabetes, muito menos os mecanismos desencadeados por seus metabólitos nesse contexto, mas sabe-se que nesta condição a via está mais ativada

Por outro lado, no desenvolvimento da gravidez saudável a via apresenta grande importância no desenvolvimento da imunotolerância materno-fetal, associada ao processo de espiralização das artérias, formação da decídua e supressão das respostas mediadas por células T ativadas. E como já relatado, uma diminuição da atividade da via está estreitamente relacionada ao aborto espontâneo e desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

Considerando a situação apresentada no DM2 e DMG, em que se observa o aumento da atividade inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio e aumento da expressão de marcadores inflamatórios no endotélio vascular e, sabendo

que a via da quinurenina parece modular o processo inflamatório em diversos tecidos, torna-se viável um estudo que busque a elucidação das ações da via da quinurenina, mais precisamente a IDO, nos quadros patológicos associados a gestação e ao diabetes.

Nesse sentido, a presente tese buscou trazer respostas que poderão contribuir com o entendimento dos mecanismos envolvidos nessa doença, bem como servir de base de dados para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos que poderão impactar diretamente na melhora da função vascular e, portanto, da morbidade e mortalidade associada ao diabetes mellitus e, mais especificamente, ao diabetes gestacional.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos relacionados à disfunção vascular associada a hiperglicemia em preparações vasculares de camundongos prenhe e não prenhe e a influência da via das quinureninas nestas condições.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos dos metabólitos da via das quinureninas na resposta vasoconstritora para fenilefrina em preparações de aorta de camundongos prenhe e não prenhe hiperglicêmicos;
- Demonstrar a influência de metabólitos da via das quinureninas na resposta vasodilatadora para acetilcolina em preparações de aorta de camundongos prenhe e não prenhe hiperglicêmicos;
- Investigar o impacto da inibição da Indoleamina 2,3-dioxigenase na disfunção vascular associado ao quadro hiperglicêmico;
- Determinar o impacto da inibição da Quinurenina-3-monooxigenase no processo de disfunção vascular associado ao quadro hiperglicêmico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA 167/2019 FMRP-USP) e os protocolos para uso de animais em experimentação foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) no Laboratório de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto, sob coordenação da Profa Doutora Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

5.1 Animais

Para a realização dos ensaios experimentais, foram utilizados camundongos fêmeas (30-35 g, n=120) e machos (30-35 g, n=20) adultos da linhagem C57-BL06, com idade de 6-8 semanas, provenientes do Biotério da Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paula – Ribeirão Preto (FMRP/USP). Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas de polietileno (n=4 por gaiola) com água e ração *ad libitum*, à temperatura de 22 °C, obedecendo ao foto período artificial de 12/12 horas claro-escuro. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia – FMRP/USP.

5.2 Grupos Experimentais

Para a realização dos ensaios experimentais, os animais foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos, conforme intervenção empregada:

Grupo I (n=20): Camundongos Não Prenhe Normoglicêmicas;

Grupo II (n=40): Camundongos Não Prenhe Hiperglicêmicas;

Grupo III (n=20): Camundongos Prenhe Normoglicêmicas;

Grupo IV (n=40): Camundongos Prenhe Hiperglicêmicas.

Os machos foram utilizados apenas para o período de acasalamento com as fêmeas (2♀:1♂). Para cada grupo, foram realizados 10 protocolos experimentais em

anéis aórticos para a avaliação da função vascular na presença de inibidores ou metabólitos da via das quinureninas. Além da reatividade vascular realizada, foram coletadas amostras de soro para a dosagem de quinureninas e citocinas pró e anti-inflamatórias de todos os grupos experimentais.

5.3 Acompanhamento do ciclo estral

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizados camundongos fêmeas na fase de estro, fase em que o metabolismo do organismo feminino sofre menos influências hormonais. Para a identificação do estágio do ciclo estral foi realizado o exame de lavados vaginais. O lavado vaginal foi realizado diariamente entre 7 e 9 h da manhã, conforme protocolo padronizado por Montes e Luque, 1988. A predominância de células cornificadas anucleadas caracterizou a fase de estro.

5.4 Acasalamento e Prenhez

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizados camundongos prenhe no vigésimo dia de prenhez, fase em que o organismo do camundongo passa por adaptações hemodinâmicas semelhantes ao organismo feminino humano. Para a determinação da prenhez, foi realizado o exame de lavados vaginais. O lavado vaginal foi realizado diariamente entre 7 e 9 h da manhã em fêmeas em período de acasalamento, conforme protocolo padronizado por Montes e Luque, 1988. A presença de espermatozoides nas lâminas caracterizou o dia 0 da gestação.

5.5 Indução da Hiperglicemia

Para avaliar o comprometimento da resposta vascular da aorta de camundongos prenhe e não prenhe hiperglicêmicas, foram selecionados, randomicamente, 80 animais para compor os grupos II e IV (Não Prenhe Hiperglicêmica e Prenhe Hiperglicêmica). Os animais destes grupos foram, primeiramente, submetidos a uma dieta rica em lipídeos DH, durante o período de 10 semanas.

Ao final da décima semana, o grupo Não Prenhe Hiperglicêmica recebeu duas doses (com intervalo de uma semana), por via intraperitoneal (i.p) de estreptozotocina

(100 mg/kg de massa corpórea – diluída em tampão citrato de sódio 0,01 M com o pH ajustado em 4,5) para a indução da hiperglicemia. Após 7 dias da administração da segunda dose de estreptozotocina, foi determinada a glicemia dos animais sob jejum de 8 horas.

Após as 10 semanas de dieta hiperlipídica, os animais do grupo prenhe hiperglicêmicas foram colocados para acasalar com machos (2♀:1♂). Posteriormente a confirmação da prenhez pelo lavado vaginal, as fêmeas foram separadas dos machos e continuaram recebendo a dieta durante todo o período da prenhez. Foram consideradas hiperglicêmicas, em ambos os grupos, aquelas que apresentarem glicemia superior a 150mg/dL, conforme protocolo descrito por Correia e colaboradores (2012).

5.6 Teste de Tolerância a Insulina

No teste de tolerância a insulina os animais foram pesados e submetidos a um jejum de 6 horas. Após o período de jejum, foi administrado 10 UI/Kg de insulina regular (NOVOLIN®), por via intraperitoneal. A glicemia capilar caudal foi mensurada com glicosímetro de Beckmann (BAYER CONTOUR™ TS MS:80384380012) antes (tempo zero – glicemia basal) e após a administração da insulina nos tempos de 3, 5, 10 e 15 minutos. As médias glicêmicas foram plotadas e analisadas para a definição do perfil glicêmico dos animais.

5.7 Peso dos animais

O peso das fêmeas, bem como o peso dos fetos no vigésimo dia da prenhez foi medido em balança analítica para avaliar se a dieta hiperlipídica promoveu alteração significativa na condição não prenhe, prenhe e no desenvolvimento estrutural dos fetos.

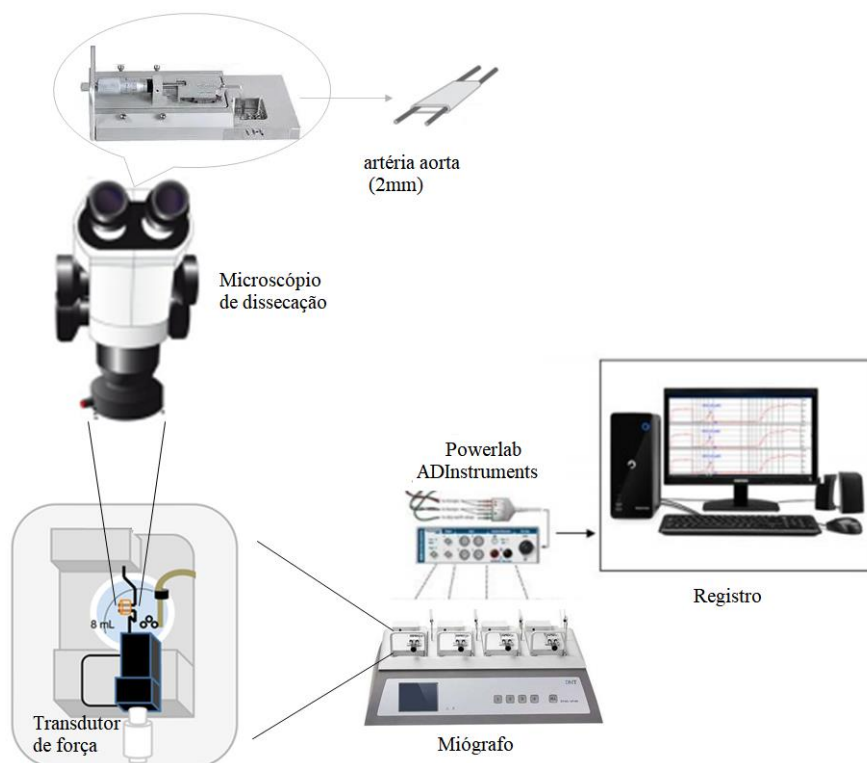
5.8 Reatividade vascular

Para estudar a reatividade vascular em artérias aortas de camundongos, foi utilizado o método descrito por Mulvany e Halpern (1977). Após anestesia e

exsanguinação, por coleta do sangue, foi realizada laparotomia mediana com exposição da cavidade torácica. A aorta torácica foi removida, isolada e dissecada de tecidos conectivos para a obtenção de anéis aórticos de 2,0 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio de dissecação. O procedimento foi realizado em placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4° C (composição em mM: 118-NaCl; 4,7-KCl; 25-NaHCO₃; 2,5-CaCl₂; 1,2-KH₂PO₄; 1,2-MgSO₄; 0,01-EDTA e 11-glicose).

Dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen de cada anel vascular e montados em um miógrafo para estudos de tensão isométrica (transdutor isométrico Panlab,). Um dos ganchos foi acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permite o estiramento das artérias. O miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este a um computador (Figura 14).

Figura 14: Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria aorta para a realização dos estudos de reatividade vascular in vitro.



Modificado de Mulvany e Halpern (1977)

Após protocolo de montagem, as artérias foram estabilizadas por 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com mistura carbogênica (95% de CO₂ e 5% de O₂, pH 7,4) e mantida à temperatura de 37 °C. Transcorrido o período de estabilização, as artérias foram estiradas em intervalos de 15 minutos, iniciando em 1mN até alcançar uma tensão de repouso de 5mN, considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno.

Após o período de estabilização aórtica na tensão de estiramento ideal, foi adicionado a cuba solução de Krebs-KCl 120mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Ao atingir o platô de contração máxima registrada, os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs Henseleit para seu retorno à tensão basal.

Após 30 minutos de estabilização, foi avaliada a integridade do endotélio por meio da presença de respostas vasodilatadoras para acetilcolina (10⁻⁶M) em preparações pré-contraídas com a EC₅₀ da fenilefrina (10⁻⁷M), com tensão passiva estabelecida de 5mN. Os anéis aórticos dos grupos controle (não prehe normoglicêmicas e prehe normoglicêmicas) que não alcançaram 80% de relaxamento foram descartados. Os anéis foram novamente lavados 3 vezes obedecendo o intervalo de 15 minutos para cada lavagem. Transcorrido esse período, os anéis estavam aptos para a realização dos protocolos experimentais.

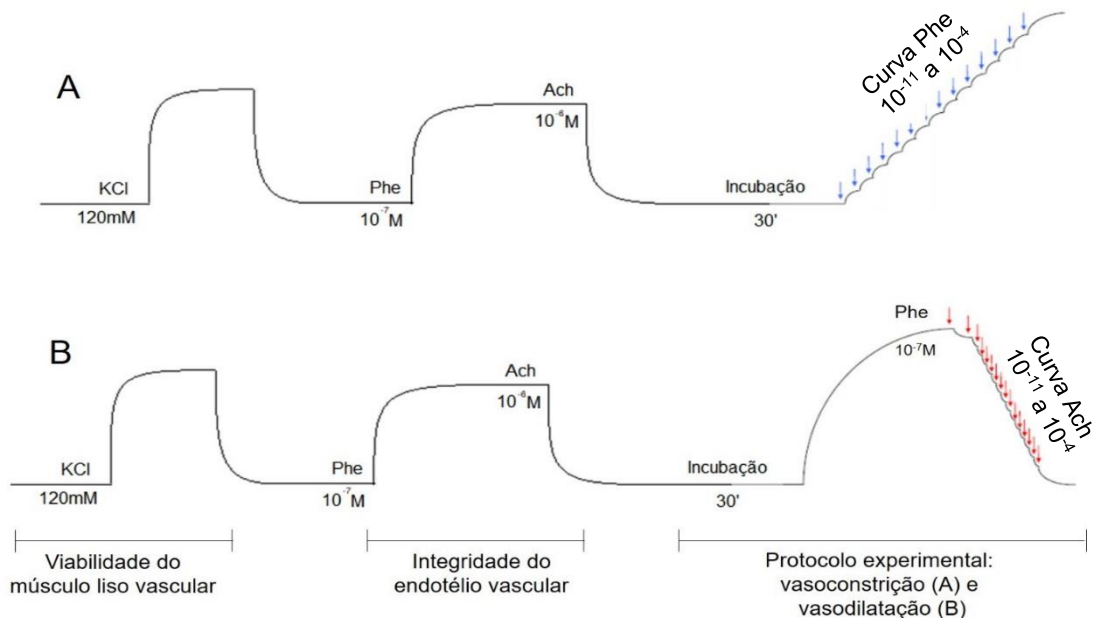
5.9 Protocolos experimentais

Após a avaliação da integridade do músculo liso e do endotélio vascular, foram analisados os efeitos dos inibidores da Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO - 1mM) e da quinurenina-3-monooxigenase (KMO - 0,1mM) e os efeitos dos metabólitos quinurenina (KYN - 0,1mM), ácido quinurênico (Ac. KYN - 0,1mM) e 3-hidroxiquinurenina (3HKYN - 0,1mM) sobre a função vasoconstritora e vasodilatadora.

Curvas de concentração-efeito para fenilefrina (Phe), um agonista alfa-adrenérgico, e acetilcolina (Ach), vasodilatador dependente do endotélio, foram realizadas em anéis pré-incubados por 30 minutos com inibidores ou metabólitos da via das quinureninas.

Decorrido o período de incubação, concentrações crescentes de Phe ou Ach (10^{-11} a 10^{-4} M) foram adicionadas à cuba para verificar se a via das quinureninas afeta a responsividade vascular constritora e/ou dilatadora. O efeito contrátil das concentrações crescentes de Phe foi normalizado em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM) (%). A resposta vasodilatadora induzida por Ach foi avaliada em anéis previamente pré-contraídos com Phe (10^{-7} M) após o alcance do platô (Figura 15).

Figura 15 - Esquema representativo das curvas que avaliam a viabilidade do músculo liso vascular, integridade funcional do endotélio e curvas de concentração-efeito para avaliar a vasoconstrição frente à fenilefrina (A) e vasodilatação frente à acetilcolina (B) em anéis pré-incubados com inibidores ou metabólitos da via das quinureninas



5.10 Análise estatística

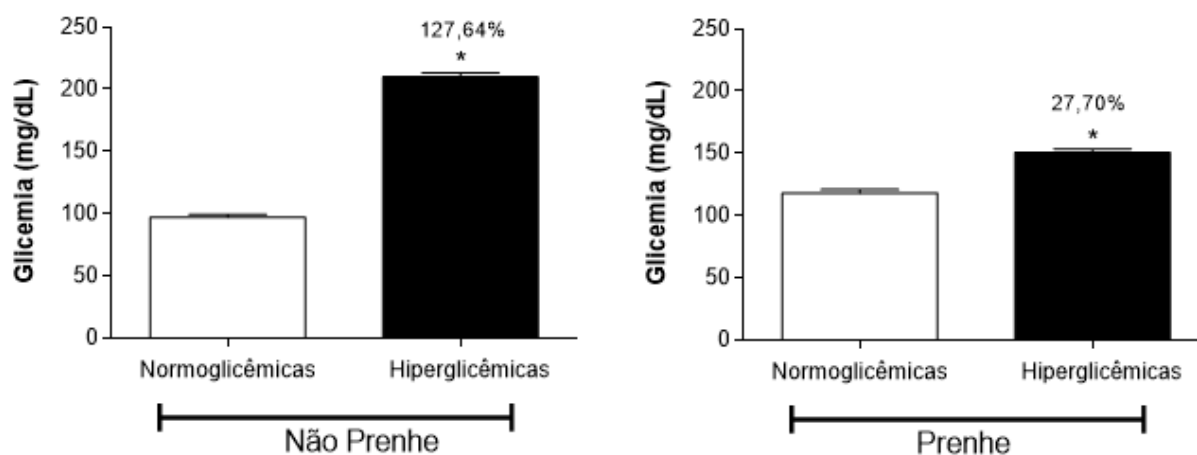
Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, onde "n" correspondeu ao número de observações. Os dados foram analisados utilizando Teste T-student ou ANOVA seguida de pós-teste de Tukey quando apropriados. Um valor de $P < 0,05$ foi utilizado para demonstrar diferenças entre os grupos de dados. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Efeitos da hiperglicemia em camundongos não prenhe e no desenvolvimento da prenhez

O tratamento com a DH ou com DH+STZ pelo período de 3 meses aumentou de forma significativa a glicemia de animais prenhe e não prenhe, respectivamente ($P < 0,5$). A média glicêmica dos animais não prenhe que receberam a dieta padrão foi de $97,25 \pm 2,17$ mg/dL, enquanto que a média glicêmica dos animais que receberam a DH+STZ foi de $210 \pm 3,25$ mg/dL. A média glicêmica dos animais prenhe que receberam a dieta padrão foi de $118,25 \pm 2,75$ mg/dL, enquanto que a média glicêmica dos animais que receberam a DH foi de $151 \pm 2,45$ mg/dL (Figura 16).

Figura 16 - Níveis glicêmicos de animais não prenhe submetidas ao tratamento com Dieta hiperlipídica em associação com dose única de estreptozotocina e animais prenhe submetidas ao tratamento com dieta hiperlipídica antes e após a cópula.

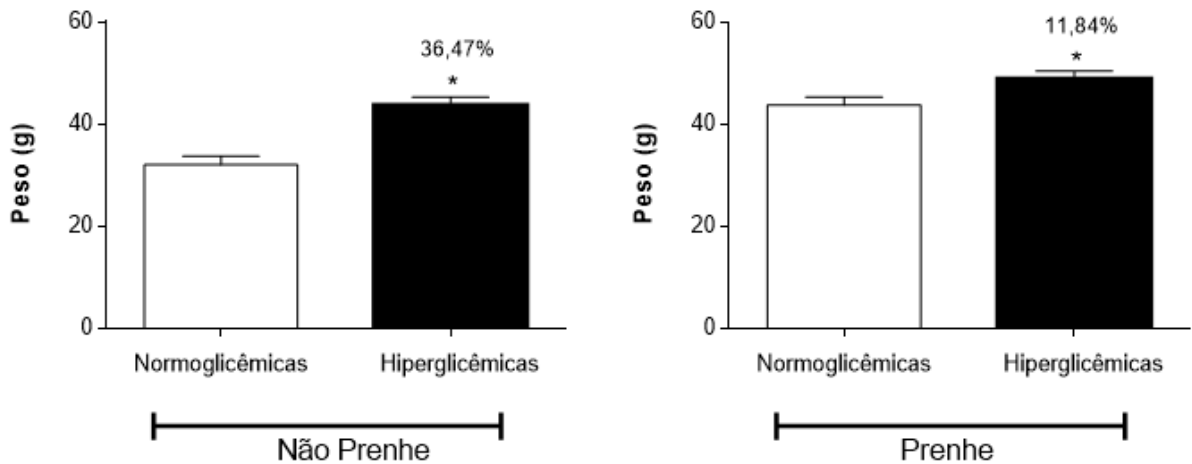


Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Teste T, $*P < 0,05$ na comparação dos grupos: Hiperglicêmica vs Normoglicêmica ($n=8$).

Para verificar se a hiperglicemia promoveria alterações no desenvolvimento da prenhez, as fêmeas submetidas ou não à dieta foram pesadas antes da realização dos procedimentos experimentais. No vigésimo dia da prenhez, após anestesia e eutanásia, foi realizada a contagem do número de fetos e mensurado o tamanho e peso dos fetos. Nos grupos que receberam a DH ou DH+STZ, tanto em animais prenhes como não prenhe, houve aumento significativo do peso corporal (Figura 17).

Na prenhez, o consumo da DH não alterou de forma significativa o número de fetos. Em média, o número de fetos foi semelhante entre os dois grupos, variando de 6 a 10 fetos por prenhez.

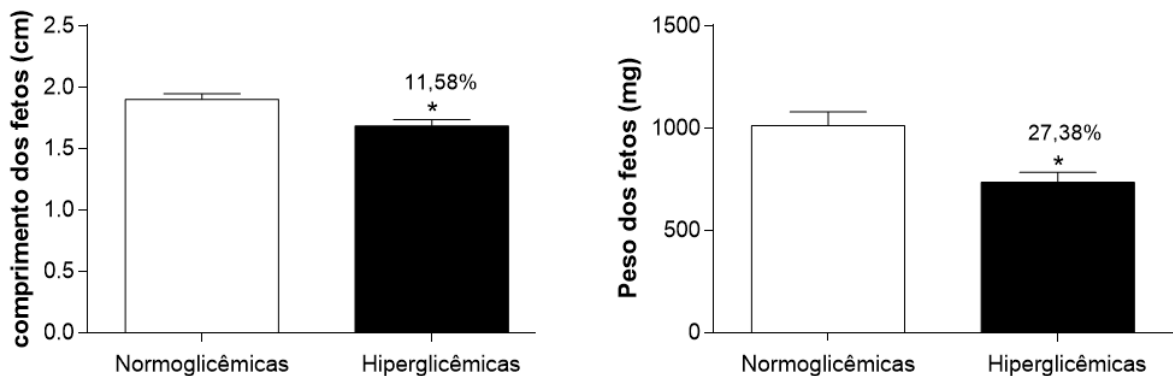
Figura 17 - Ganho de massa corporal de animais não prenhe e prenhe antes e após o tratamento com a dieta hiperlipídica.



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Teste T, * $p < 0,05$ na comparação dos grupos: Hiperglicêmica vs Normoglicêmica (n=8).

Em relação ao tamanho e peso dos fetos, a DH promoveu alterações significativas. Houve uma diminuição no comprimento e peso dos fetos de camundongos prenhe que receberam DH quando comparadas ao grupo que recebeu a dieta padrão, evidenciando que as alterações metabólicas desencadeadas pelo consumo de uma dieta rica em gorduras comprometem o desenvolvimento fetal normal (Figura 18).

Figura 18 - Impacto do consumo da dieta hiperlipídica no desenvolvimento fetal de camundongos.

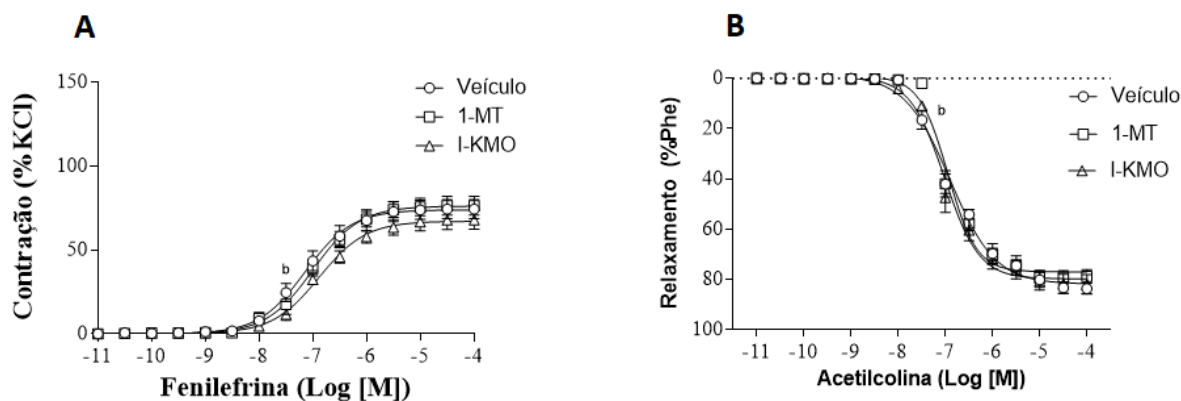


Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Teste T, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: Hiperglicêmica vs Normoglicêmica (n=8).

6.2 Efeitos de inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos normoglicêmicas

A pré-incubação de anéis de aorta de camundongos fêmeas com o inibidor da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (1-MT) não modificou a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina (Figura 19-A) ou vasodilatadora para acetilcolina (Figura 19-B) em condições normoglicêmicas. Já o inibidor da quinurenina-3-monooxygenase (I-KMO) reduziu a resposta vasoconstritora, sem alterar a resposta vasodilatadora.

Figura 19: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas normoglicêmicas na presença de endotélio vascular



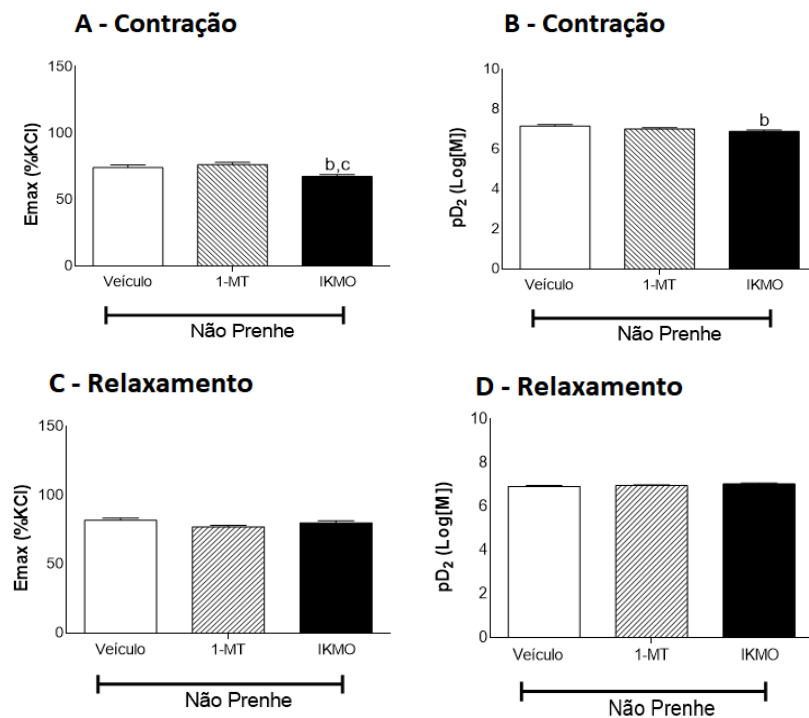
Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. ANOVA, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^a1-MT vs Veículo; ^bI-KMO vs Veículo ($n = 6-8$). 1-MT: 1-metilriptofano (1mM); I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase (0,1mM).

Para avaliar alterações na eficácia e potência da resposta vasoconstritora e vasodilatadora na presença ou ausência dos inibidores da via, utilizou-se a análise de regressão não linear para o cálculo dos valores da Resposta Máxima (E_{max}) e Concentração Efetiva Média (EC_{50}), demonstrado em logaritmo negativo da EC_{50} (pD_2).

Em anéis pré-incubados com 1-MT, não foi observado alterações significativas, em condições normais, na eficácia (1-MT: $76,23 \pm 1,72$ x Veículo: $74,02 \pm 1,91$) e potência (1-MT: $6,99 \pm 0,067$ x Veículo: $7,14 \pm 0,07$) da resposta vasoconstritora e eficácia (1-MT: $76,93 \pm 1,14$ x Veículo: $81,82 \pm 1,55$) e potência (1-MT: $6,94 \pm 0,03$ x Veículo: $6,90 \pm 0,04$) vasodilatadora.

Entretanto, a pré-incubação com o I-KMO, reduziu de forma significativa, o Emax (I-KMO: $67,25 \pm 1,59$ x Veículo: $74,02 \pm 1,91$) e o pD₂ (I-KMO: $6,88 \pm 0,06 \pm 1,59$ x Veículo: $7,14 \pm 0,07$) da resposta contrátil frente a Phe, sem modificar Emax (I-KMO: $79,75 \pm 1,51 \pm 1,59$ x Veículo: $81,82 \pm 1,55$) e pD₂ (I-KMO: $7,01 \pm 0,046 \pm 1,59$ x Veículo: $6,90 \pm 0,04$) da resposta vasodilatadora (Figura 20).

Figura 20: Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.



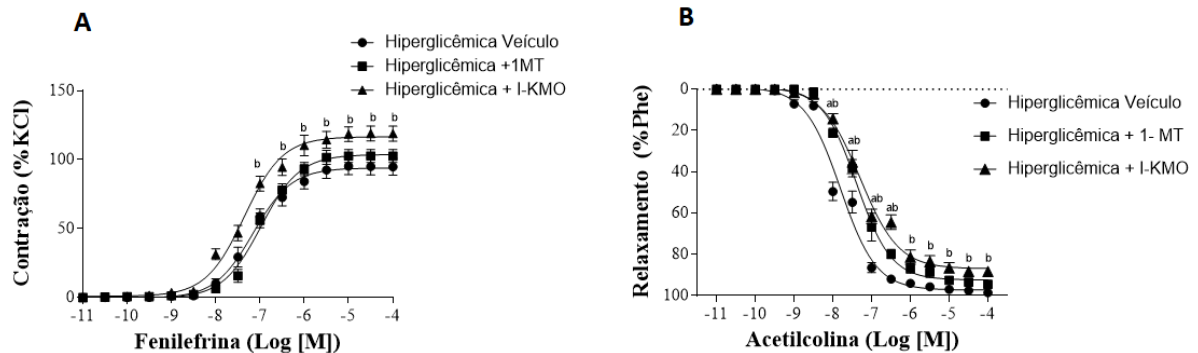
Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, ^a $P < 0.05$ vs. veículo. ^b $P < 0.05$ vs. 1-MT (n= 6-8). 1-MT: 1-metiltryptofano (1mM); I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase (0,1mM).

6.3 Efeitos dos inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos hiperglicêmicas.

A resposta vascular à Phe e Ach em anéis aórticos de camundongos fêmeas submetidas à DH associada a estreptozotocina foi analisada (Figura 21). Como observado, a inibição da KMO promoveu maiores efeitos sobre a curva concentração-

efeito tanto na vasoconstrição quanto na vasodilatação. A inibição da IDO mediada pelo 1-MT, promoveu alteração apenas na curva referente a Ach.

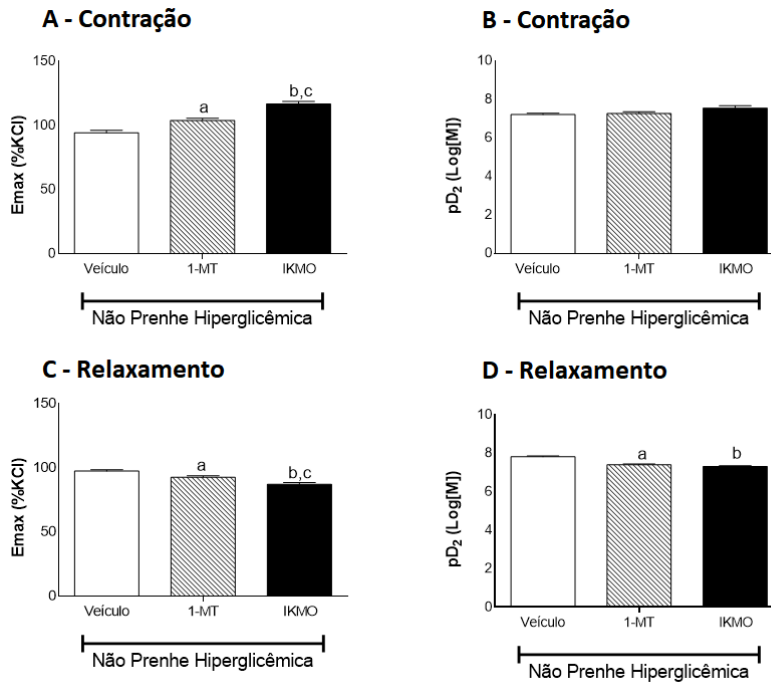
Figura 21 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas hiperglicêmicas na presença de endotélio (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^a1-MT vs Veículo; ^bI-KMO vs Veículo ($n = 6-8$). 1-MT: 1-metiltryptano; I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase.

A inibição da IDO e da KMO resultou em aumento significativo da E_{max} da resposta vasoconstritora (1-MT: $103,70 \pm 1,72$ e IKMO: $116,6 \pm 1,94$ x Veículo: $94,01 \pm 2,02$, $P < 0,05$) e diminuição da E_{max} (1-MT: $97,26 \pm 1,17$ e IKMO: $86,95 \pm 1,43$ x Veículo: $92,40 \pm 1,26$, $P < 0,05$) e pD_2 (1-MT: $103,70 \pm 1,72$ e IKMO: $7,39 \pm 0,03$ x Veículo: $7,80 \pm 0,03$, $P < 0,05$) da resposta vasodilatadora (Figura 22).

Figura 22 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos hiperglicêmicos pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, ^a $P < 0.05$ vs. veículo. ^b $P < 0.05$ vs. 1-MT (n= 6-8). 1-MT: 1-metilriptofano (1mM); I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monoxygenase (0,1mM).

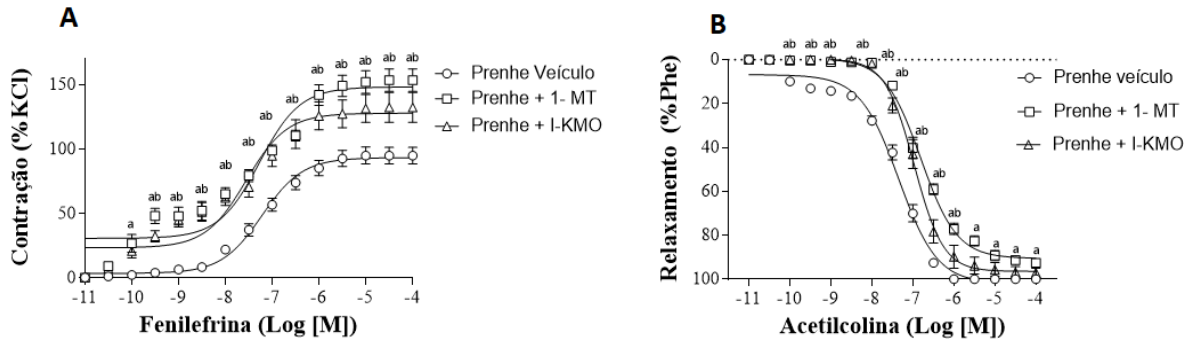
6.4 Efeitos dos inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe.

Os inibidores da via das quinureninas promoveram importantes modificações na função vascular de camundongos no final da prenhez, evidenciando a importância da via na homeostase no ciclo gravídico (Figura 23). Esses resultados são melhor evidenciados nos gráficos referentes ao Emax e pD₂ (Figura 24 A, B, C e D).

Como é possível observar, os dois inibidores aumentaram a Emax da Phe (1-MT: $148,2 \pm 3,79$ e IKMO: $127,8 \pm 3,93$ x Veículo: $93,36 \pm 2,02$, $P < 0,05$). Somente o I-KMO, aumentou de forma significativa o pD₂ (I-KMO: $7,35 \pm 0,053$ x Veículo: $7,15 \pm 0$, $P < 0,05$) da resposta vasoconstritora da Phe.

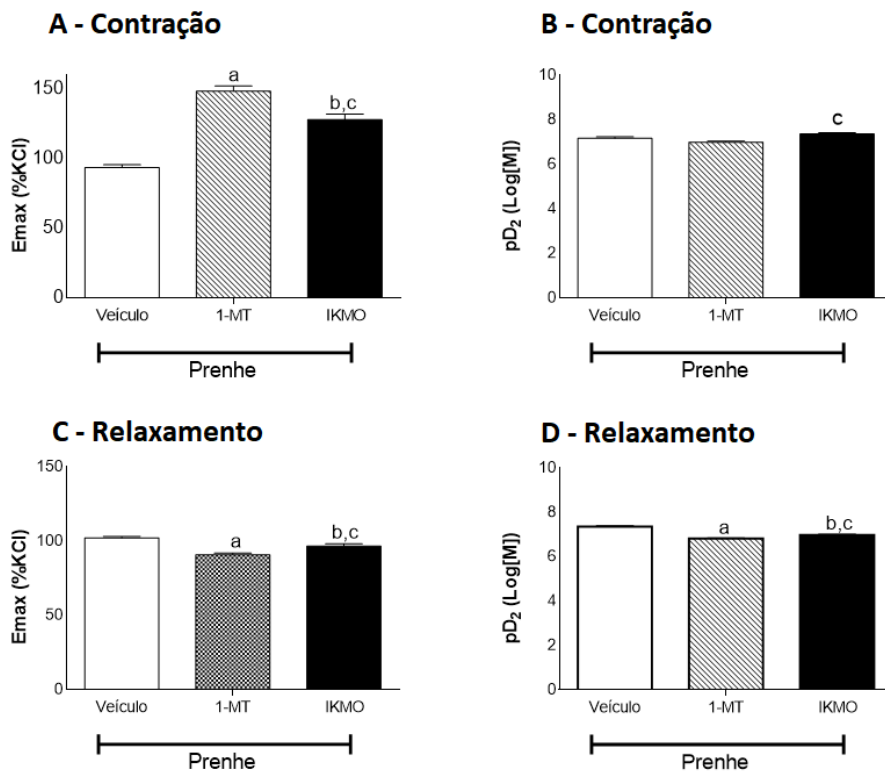
Os resultados referentes a vasodilatação demonstram redução na Emax (1-MT: $90,53 \pm 1,2$ e IKMO: $96,45 \pm 1,5$ x Veículo: $101,9 \pm 0,98$, $P < 0,05$) e pD₂ (1-MT: $6,8 \pm 0,03$ e IKMO: $6,96 \pm 0,03$ x Veículo: $7,34 \pm 0,02$, $P < 0,05$) da Ach, mediada pelos dois inibidores da via.

Figura 23 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos prenhe na presença de endotélio (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^a1-MT vs Veículo; ^bI-KMO vs Veículo ($n = 6-8$). 1-MT: 1-metiltryptofano (1mM); I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase (0,1mM).

Figura 24 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos prenhe pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.



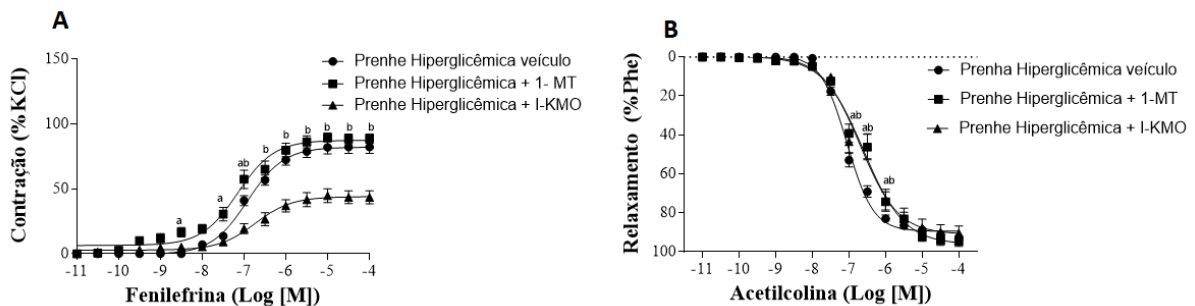
Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, ^a $P < 0,05$ vs. veículo. ^b $P < 0,05$ vs. 1-MT ($n = 6-8$). 1-MT: 1-metiltryptofano (1mM); I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase (0,1mM).

6.5 Efeitos dos inibidores da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe hiperglicêmicas.

Na prenhez hiperglicêmica a inibição da IDO por 1-MT não promoveu alteração na resposta vasoconstritora. Resultado diferente foi observado para o inibidor da KMO, o qual reduziu o Emax (I-KMO: $44,00 \pm 1,66$ x Veículo: $82,17 \pm 1,46$, $P < 0,05$) e a potência (I-KMO: $6,73 \pm 0,11$ x Veículo: $6,91 \pm 0,05$, $P < 0,05$) da Phe (Figura 25 e 26).

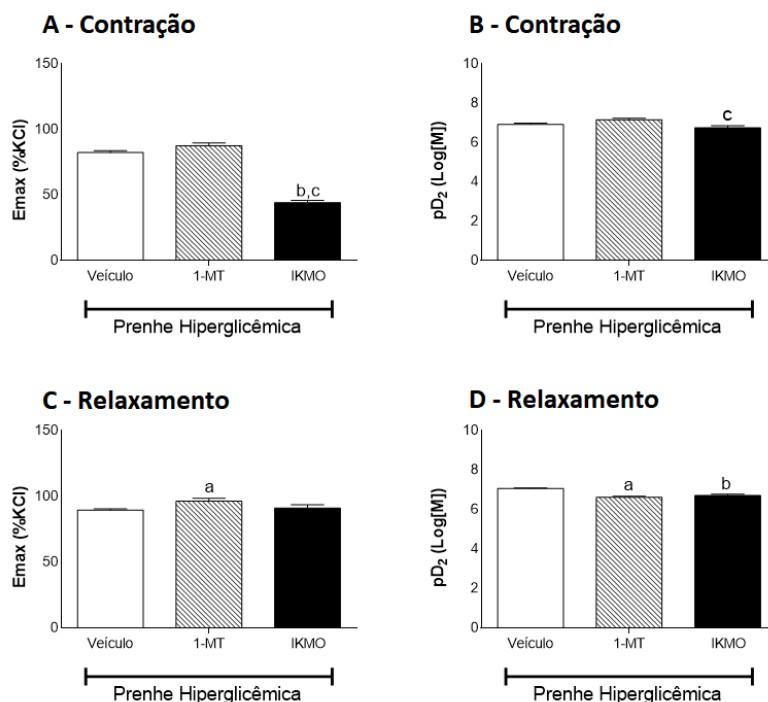
Nos resultados referentes a vasodilatação, o 1-MT aumentou significativamente a Emax (1-MT: $96,13 \pm 2,23$ x Veículo: $43 \pm 0,89$, $P < 0,05$) da resposta vasodilatadora induzida por Ach, mas reduziu o pD₂ (1-MT: $6,6 \pm 0,05$ x Veículo: $7,05 \pm 0,02$, $P < 0,05$). O I-KMO não alterou a resposta máxima vasodilatadora para Ach, mas reduziu o pD₂ a (I-KMO: $7,05 \pm 0,002$, $P < 0,05$).

Figura 25 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos prenhe hiperglicêmicas na presença de endotélio (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $p < 0,05$ na comparação dos grupos: ^a1-MT vs Veículo; ^bI-KMO vs Veículo (n= 6-8). 1-MT: 1-metilriptofano; I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase.

Figura 26 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos prenhe hiperglicêmicas pré-incubadas com 1-MT e I-KMO.



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, ^a $P < 0.05$ vs. veículo. ^b $P < 0.05$ vs. 1-MT (n= 6-8). 1-MT: 1-metiltryptofano (1mM); I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase (0,1mM).

Os resultados encontrados nestes ensaios evidenciam que dependendo do quadro em que se encontra o organismo feminino: normoglicêmico, grávidico, hiperglicêmico ou grávidico hiperglicêmico, a resposta vascular sofre diferentes alterações decorrentes da inibição das quinureninas. Na tabela 10, reunimos os dados apresentados para cada grupo e fizemos uma nova análise a fim de identificar qual grupo sofre maior alteração decorrente dessa inibição.

A análise dos efeitos do 1-MT sobre as condições experimentais deste estudo evidenciou que a inibição do catabolismo do TRP em quinureninas desencadeia diferentes ações na função vascular. Com exceção do grupo de fêmeas normoglicêmicas e prenhe hiperglicêmicas, o 1-MT promoveu aumento significativo da resposta máxima vasoconstritora nos grupos analisados e este aumento foi mais expressivo na condição prenhe. Em relação a potência vasoconstritora da fenilefrina, não houve alteração em nenhum grupo analisado.

Na resposta vasodilatadora, o 1-MT reduziu a eficácia da Ach somente nos grupos prenhe normoglicêmicas e não prenhe hiperglicêmicas. Emax em prenhe hiper aumentou!!! A potência da Ach foi reduzida nos grupos não prenhe hiperglicêmica,

prenhe normoglicêmica e prenhe hiperglicêmica, com maior redução no grupo prenhe hiperglicêmica.

As alterações da resposta vasoconstritora mediadas pela inibição da KMO ocorreram em todos os grupos avaliados, porém diferiu conforme a intervenção de cada grupo. Ao avaliar a prenhez, essa inibição promoveu significativo aumento da resposta máxima e da potência vasoconstritora de animais prenhe normoglicêmicas. Nos grupos não prenhe normoglicêmicas e prenhe hiperglicêmica houve uma redução dessas respostas, sendo mais expressiva em animais prenhe hiperglicêmicas. Na análise da condição não prenhe em animais normoglicêmicos houve uma significativa redução da resposta máxima e da potência vasoconstritora, enquanto que na condição hiperglicêmica de animais não prenhe, houve um aumento da eficácia e potência vasoconstritora.

Na resposta vasodilatadora, a inibição da KMO foi menos expressiva entre os grupos. Houve um aumento da eficácia vasodilatadora em animais prenhe normoglicêmicas, enquanto que na condição hiperglicêmica não alterou essa resposta. A alteração da potência vasodilatadora ocorreu apenas no grupo de fêmeas não prenhe hiperglicêmicas que tiveram a potência vasodilatadora da Ach aumentada quando comparada a condição normoglicêmica.

Tabela 10 - Efeitos da inibição da via das quinureninas nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora de camundongos não prenhe e prenhe em condições normo e hiperglicêmicas.

Efeitos da inibição da Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO)								
	Vasoconstrição				Vasodilatação			
	Emax		pD2		Emax		pD2	
	Veículo	1-MT	Veículo	1-MT	Veículo	1-MT	Veículo	1-MT
NP-Normo	74,02±1,91	76,23±1,72	7,14±0,07	6,99±0,06	81,82±1,55	76,93±1,14	6,90±0,04	6,94±0,03
P-Normo	93,36±2,02	148,2±3,79 ^a	7,15±0,06	6,97±0,05	101,9±0,98	90,53±1,2 ^a	7,34±0,02	6,8±0,03 [*]
NP - Hiper	94,01±2,02	103,70±1,72 ^b	7,21±0,06	7,27±0,10	97,26±1,17	92,40±1,26 ^b	7,80±0,03	7,39±0,03 ^{* b}
P - Hiper	82,17±1,46	87,49±1,94 ^c	6,91±0,05	7,14±0,07	89,43±0,89	96,13±2,23 [*]	7,05±0,02	6,6±0,05 ^{* c}

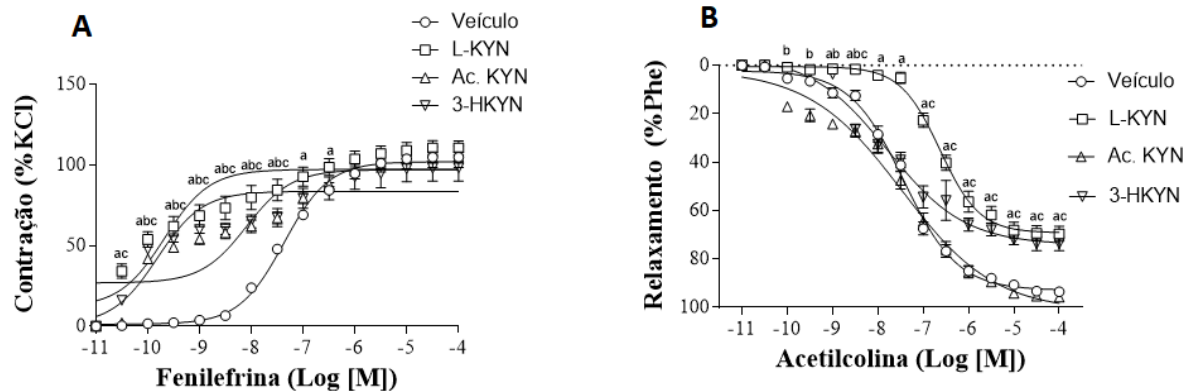
Efeitos da inibição da Quinurenina-3-monooxygenase (KMO)								
	Vasoconstrição				Vasodilatação			
	Emax		pD2		Emax		pD2	
	Veículo	I-KMO	Veículo	I-KMO	Veículo	I-KMO	Veículo	I-KMO
NP-Normo	74,02±1,91	67,25±1,59 [*]	7,14±0,07	6,88±0,06 [*]	81,82±1,55	79,75±1,51	6,90±0,04	7,01±0,046
P-Normo	93,36±2,02	127,8±3,93 ^{* a}	7,15±0,06	7,35±0,053 ^a	101,9±0,98	96,45±1,5 ^{* a}	7,34±0,02	6,96±0,03 [*]
NP - Hiper	94,01±2,02	116,6±1,94 ^{* b}	7,21±0,06	7,55±0,12 ^b	97,26±1,17	86,95±1,43 [*]	7,80±0,03	7,30±0,04 ^{* b}
P - Hiper	82,17±1,46	44,00±1,66 ^{* c}	6,91±0,05	6,73±0,11 ^c	89,43±0,89	90,97±2,47	7,05±0,02	6,69±0,06 ^c

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA, $p < 0,05$ na comparação dos grupos: ^{*} $P < 0,05$ vs Veículo; ^a $P < 0,05$ Prenhe Normoglicêmica vs Não Prenhe Normoglicêmica; ^b $P < 0,05$ Não Prenhe Hiperglicêmica vs Não Prenhe Normoglicêmica; ^c $P < 0,05$ Prenhe Hiperglicêmica vs Prenhe Normoglicêmica. (n= 6-8). 1-MT: 1-metiltryptofano; I-KMO: Inibidor da Quinurenina-3-monooxygenase

6.6 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos fêmeas normoglicêmicas não prenhes.

As mesmas análises descritas anteriormente foram realizadas para avaliar os efeitos de diferentes metabólitos produzidos pela rota metabólica das quinureninas. O meio que continha os anéis aórticos foi enriquecido com L-KYN, Ac. KYN ou 3HKYN e o efeito vasoconstritor e vasodilatador foi analisado. Como é possível observar na figura 27 (A e B), os metabólitos modificaram ambas as respostas, como discutido a seguir.

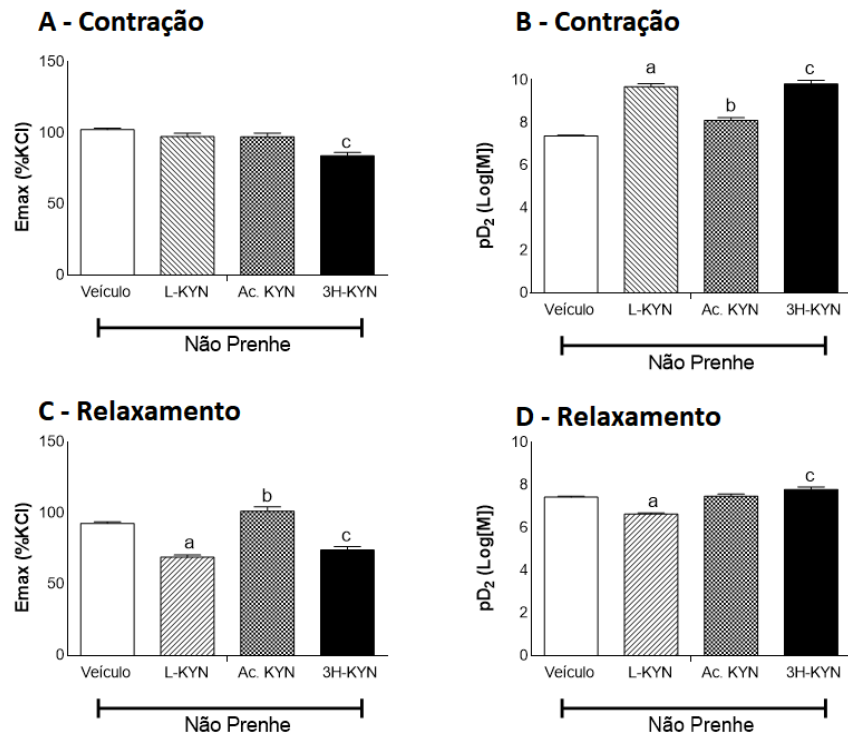
Figura 27 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas normoglicêmicas não prenhes na presença de endotélio vascular (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, $*P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^c3HKYN vs Veículo (n= 6-8). L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM).

Na função contrátil, todos os metabólitos aumentaram a potência contrátil da fenilefrina (Figura 28 e Tabela 11). O metabólito 3HKYN foi o único a reduzir a resposta máxima para Phe (Figura 28 e Tabela 11). Na resposta vasodilatadora, o Ac. KYN promoveu aumento da resposta máxima para Ach, sem alterar sua potência. L-KYN e 3HKYN reduziram tanto a eficácia, quanto a potência da resposta vasodilatadora mediada por Ach (Figura 28, tabela 11).

Figura 28 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos fêmeas em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.



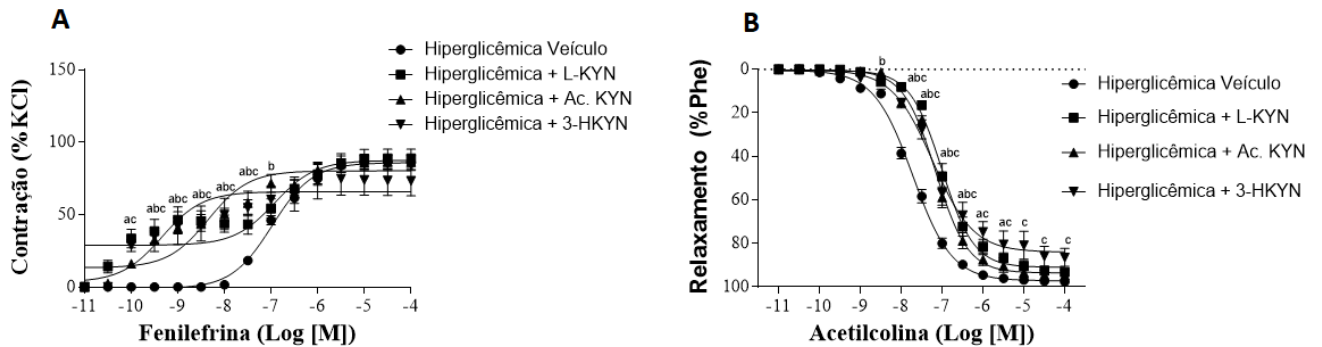
Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^c3HKYN vs Veículo (n= 6-8 L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM)).

6.7 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos hiperglicêmicas não prenhe.

Na análise dos efeitos dos metabólitos na função vascular de anéis aórticos de camundongos fêmeas hiperglicêmicas não prenhe (Figura 29) não houve diferença significativa nos valores de Emax para fenilefrina (Figura 30 e tabela 11), exceto na presença de 3HKYN, o qual reduziu o Emax para fenilefrina, quando comparado ao veículo. Por outro lado, Ac. KYN e 3HKYN aumentaram o pD₂ para a resposta vasoconstritora.

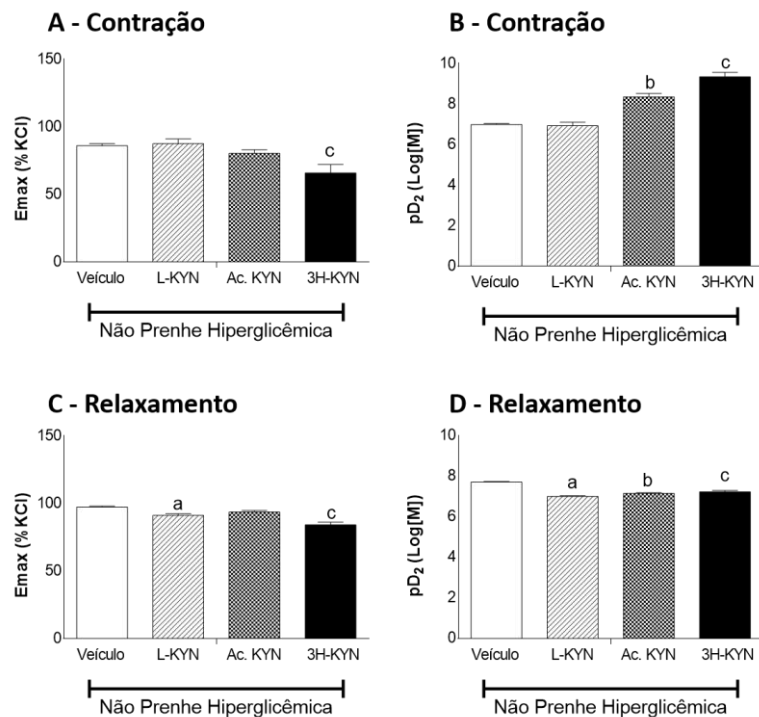
Na resposta vasodilatadora, houve diminuição da potência da Ach, mediada pelos três metabólito em relação ao veículo. Enquanto que a Emax da vasodilatação foi reduzida por L-KYN e 3HKYN e não foi modificada por Ac. KYN (Figura 30 B, C e Tabela 11).

Figura 29 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos fêmeas hiperglicêmicas na presença de endotélio (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^c3HKYN vs Veículo (n= 6-8 L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM)).

Figura 30 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos fêmeas hiperglicêmicas em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.



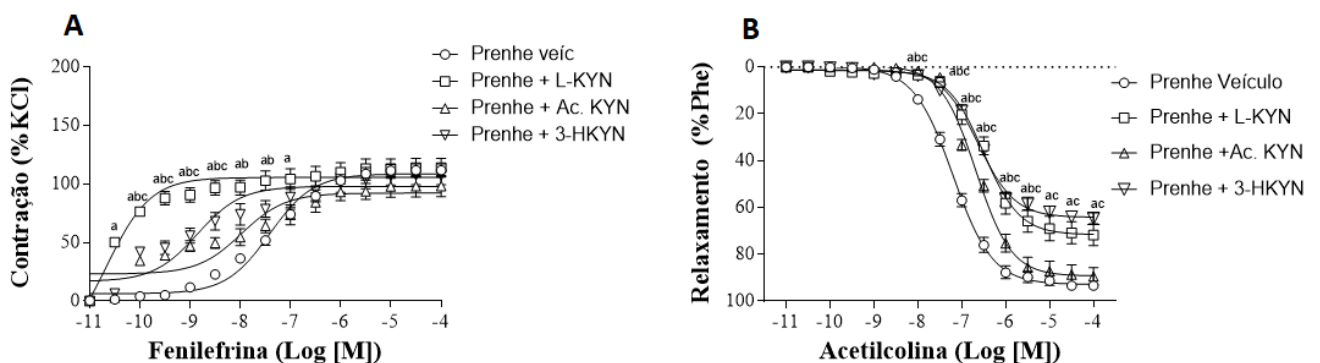
Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, $*P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^c3HKYN vs Veículo (n= 6-8). L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM).

6.8 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe normoglicêmicas.

A resposta máxima vasoconstritora induzida por fenilefrina foi significativamente reduzida na presença de Ac. KYN e 3HKYN em anéis aórticos de camundongos prenhe normoglicêmicas, porém foram potencializadas nessas condições (Figuras 31 e 32, Tabela 11). A presença de L-KYN aumentou a potencialização da resposta vasoconstritora quando comparada ao controle (Figuras 32, Tabela 11). O efeito máximo para fenilefrina não foi modificado por L-KYN.

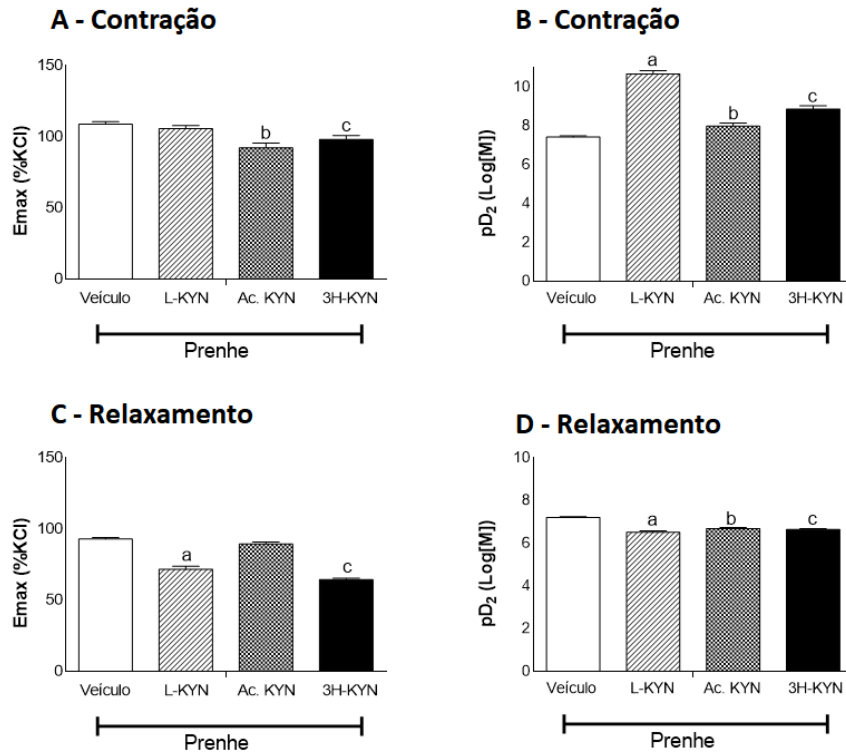
Os efeitos dos metabólitos na função vascular promoveram a potencialização da função contrátil (Figura 31 A). Enquanto que na resposta vasodilatadora, houve redução da potência e eficácia nos grupos enriquecidos com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN (Figura 31 B). A resposta vasodilatadora não foi modificada pela presença de Ac. KYN (Figuras 32, Tabela 11). L-KYN e 3HKYN reduziram o efeito máximo vasodilatador para Ach quando comparado ao controle (Figuras 32, Tabela 11). A potência vasodilatadora da Ach foi reduzida pela pré-incubação com todos os metabólitos utilizados (Figura 32).

Figura 31 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos prenhe na presença de endotélio (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $p < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^c3HKYN vs Veículo ($n = 6-8$). L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM).

Figura 32 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos prenhe em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.



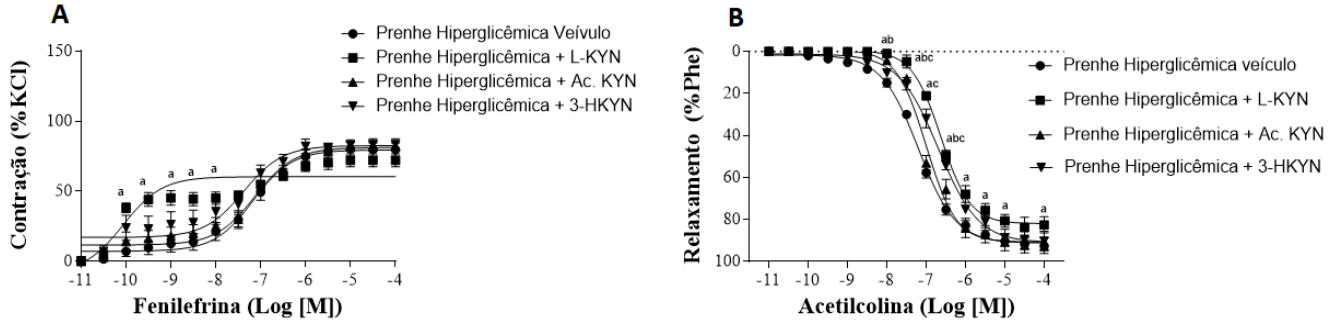
Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^c3HKYN vs Veículo ($n = 6-8$). L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM).

7.9 Efeitos de metabólitos da via das quinureninas na resposta vascular de camundongos prenhe hiperglicêmicas.

Na prenhez hiperglicêmica foi observada redução da eficácia e potencialização da resposta vasoconstritora para fenilefrina na presença de L-KYN (Figura 33 e 34, Tabela 11). Os metabólitos Ac. KYN e 3-HKYN não modificaram as respostas para fenilefrina (Figura 34 e Tabela 11).

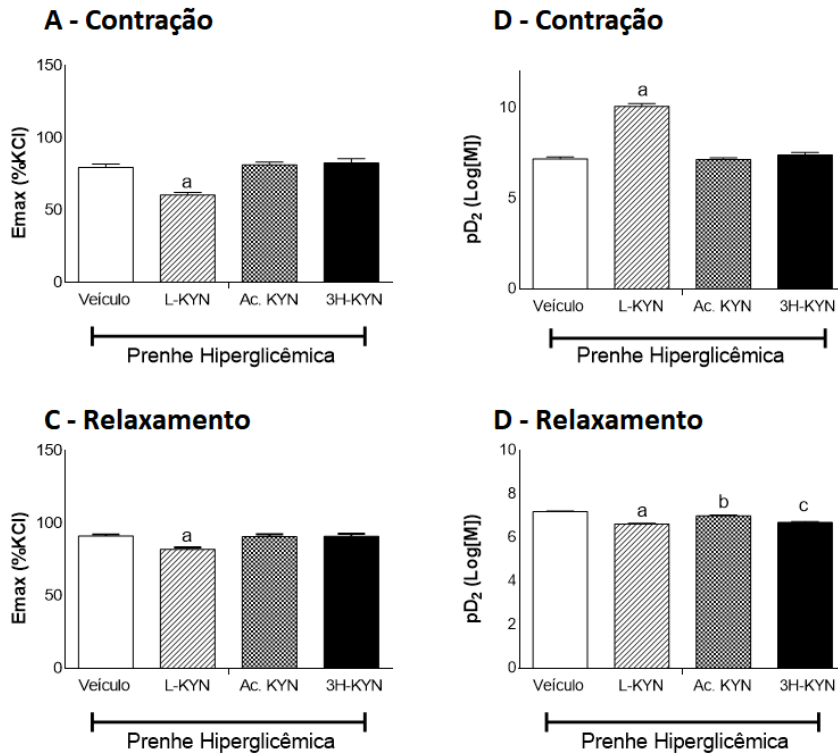
A potência vasodilatadora da acetilcolina foi reduzida pela pré-incubação com os três metabólitos utilizados (Figura 34 e Tabela 11). Somente L-KYN reduziu a eficácia vasodilatadora da acetilcolina (Figura 34 e Tabela 11) enquanto Ac. KYN e 3-HKYN não afetaram essa resposta.

Figura 33 - Curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-11} a 10^{-4} M) e acetilcolina (10^{-11} a 10^{-4} M) obtidas em anéis de aorta isoladas de camundongos prenhe hiperglicêmicas na presença de endotélio (A e B).



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $p < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^b3HKYN vs Veículo (n= 6-8). L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM).

Figura 34 - Valores de Emax e pD₂ obtidos das curvas concentração-efeito à fenilefrina e acetilcolina em artérias aórticas de camundongos prenhe hiperglicêmicas em solução enriquecida com L-KYN, Ac. KYN e 3HKYN.



Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $P < 0,05$ na comparação dos grupos: ^aL-KYN vs Veículo; ^bAc. KYN vs Veículo; ^b3HKYN vs Veículo (n= 6-8). L-KYN: L-quinurenina (0,1mM); Ac. KYN: Ácido quinurênico (0,1mM); 3HKYN: 3hidroxiquinurenina (0,1mM).

A condição hiperglicêmica durante a prenhez promoveu um padrão de resposta diferente dos outros grupos analisados. Nessa condição, a L-KYN modulou tanto a resposta contrátil, quanto a relaxante. Na função contrátil, atuou diminuindo a eficácia do vaso frente a Phe, porém aumentando sua potência vasoconstritora. Os demais

metabólitos não apresentam efeitos significativos. Na resposta vasodilatadora, somente a L-KYN reduziu a eficácia do vaso frente a Ach, enquanto que todos os metabólitos analisados reduzem a potência vasodilatadora.

7.10 Comparações entre grupos dos efeitos dos metabólitos da via das quinureninas sobre a reatividade vascular à fenilefrina e acetilcolina

Assim como demonstrado nos ensaios de reatividade com os inibidores da via das quinureninas, os resultados encontrados com os metabólitos evidenciaram que dependendo do quadro em que se encontra o organismo feminino: normoglicêmico, gravídico, hiperglicêmico ou gravídico hiperglicêmico, a resposta vascular também sofre diferentes alterações decorrentes do enriquecimento do meio com esses metabólitos. Na tabela 11, reunimos os dados apresentados para cada grupo e fizemos uma nova análise estatística a fim de identificar qual metabólito exerce maior impacto na resposta vascular, considerando os diferentes grupos analisados.

A análise dos efeitos da L-KYN sobre as condições experimentais deste estudo evidenciou que o enriquecimento do meio com este metabólito da via reduziu apenas a resposta contrátil máxima na condição prenhe hiperglicêmica. Adicionalmente, potencializou a resposta contrátil na condição prenhe e reduziu o Emax na condição não prenhe hiperglicêmica. No quadro hiperglicêmico, L-KYN diminuiu a Emax para fenilefrina, demonstrando efeito protetor no organismo que passou por alterações metabólicas mediadas pela hiperglicemia.

As alterações da resposta vasoconstritora mediadas pelo enriquecimento do meio com Ac. KYN não exerceu alteração significativas na resposta máxima contrátil, houve apenas uma redução da potência vasoconstritora no grupo prenhe hiperglicêmica quando comparado ao controle. Ac. KYN promoveu no grupo prenhe e não prenhe hiperglicêmica uma resposta vasodilatadora diminuída em relação ao veículo, tanto na resposta máxima quanto na potência, evidenciando que na resposta vascular, o Ac. KYN parece não sofrer influência sob diferentes condições, e também não exercer função protetora na resposta vascular.

O metabólito 3HKYN promoveu alterações significativas e distintas quando se comparou seus efeitos nos quatro grupos experimentais. Na prenhez normoglicêmica, aumentou a resposta máxima e reduziu a potência da resposta vasoconstritora, porém na prenhez hiperglicêmica reduziu tanto a resposta máxima quanto a potência vasoconstritora.

Ao avaliar a resposta vasodilatadora, 3HKYN reduziu tanto a resposta máxima e potência vasodilatadora máxima na condição prenhe. Já na prenhez hiperglicêmica e no grupo não prenhe hiperglicêmica houve uma melhora na resposta vasodilatadora máxima, sugerindo que esse metabólito pode reverter o prejuízo vascular causado pelo quadro hiperglicêmico (Anexo: guia de comparação entre os grupos).

Tabela 11 - Efeitos dos metabólitos da via das quinureninas nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora de camundongos não prenhe e prenhe em condições normo e hiperglicêmicas.

Efeitos da L-Quinurenina sobre a função vascular nos grupos experimentais								
	Vasoconstrição				Vasodilatação			
	Emax		pD2		Emax		pD2	
	Veículo	L-KYN	Veículo	L-KYN	Veículo	L-KYN	Veículo	L-KYN
NP-Normo	102,2±1,01	97,34±2,3	7,37±0,03	9,67±0,14*	92,93±1,14	69,19±1,51*	7,43±0,03	6,63±0,05*
P-Normo	108,7±1,75	105,6±2,1	7,41±0,05	10,66±0,26* ^a	92,87±9,98	71,61±2,01*	7,2±0,02	6,5±0,06*
NP - Hiper	85,9±1,47	87,42±3,45	6,97±0,04	6,92±0,17 ^b	97,18±0,76	91±1,27* ^b	7,71±0,02	7,01±0,03* ^b
P - Hiper	79,57±2,27	60,46±1,67* ^c	7,16±0,09	10,06±0,15*	91,23±093	81,96±1,4* ^c	7,19±0,02	6,62±0,03*

Efeitos do Ácido Quinurênico sobre a função vascular nos grupos experimentais								
	Vasoconstrição				Vasodilatação			
	Emax		pD2		Emax		pD2	
	Veículo	Ac. KYN	Veículo	Ac. KYN	Veículo	Ac. KYN	Veículo	Ac. KYN
NP-Normo	102,2±1,01	97,18±2,59	7,37±0,03	8,09±0,14*	92,93±1,14	101,6±2,95*	7,43±0,03	7,47±0,09
P-Normo	108,7±1,75	92,21±3,21*	7,41±0,05	7,97±0,016*	92,87±9,98	89,27±1,52 ^a	7,2±0,02	6,67±0,03* ^a
NP - Hiper	85,9±1,47	80,27±2,61	6,97±0,04	8,34±0,16*	97,18±0,76	93,57±1,14 ^b	7,71±0,02	7,16±0,03* ^b
P - Hiper	79,57±2,27	81,25±2,12	7,16±0,09	7,12±0,09 ^c	91,23±093	90,73±1,56	7,19±0,02	6,99±0,04* ^c

Efeitos da 3-Hidroxiquinurenina sobre a função vascular nos grupos experimentais

	Vasoconstrição				Vasodilatação			
	Emax		pD2		Emax		pD2	
	Veículo	3HKYN	Veículo	3HKYN	Veículo	3HKYN	Veículo	3HKYN
NP-Normo	102,2±1,01	83,75±2,39*	7,37±0,03	9,81±0,16*	92,93±1,14	74,18±2,36*	7,43±0,03	7,78±0,11*
P-Normo	108,7±1,75	97,93±2,87* ^a	7,41±0,05	8,85±0,16* ^a	92,87±9,98	64,26±1,1* ^a	7,2±0,02	6,62±0,04* ^a
NP - Hiper	85,9±1,47	65,81±6,31*	6,97±0,04	9,34±0,21*	97,18±0,76	84±2,07* ^b	7,71±0,02	7,23±0,07* ^b
P - Hiper	79,57±2,27	82,62±2,9 ^c	7,16±0,09	7,38±0,14 ^c	91,23±0,93	90,93±1,7 ^c	7,19±0,02	6,69±0,04*

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA, p<0,05 na comparação dos grupos: *P<0,05 vs Veículo; ^aP<0,05 Prenhe Normoglicêmica vs Não Prenhe Normoglicêmica; ^bP<0,05 Não Prenhe Hiperglicêmica vs Não Prenhe Normoglicêmica; ^cP<0,05 Prenhe Hiperglicêmica vs Prenhe Normoglicêmica (n=6-8). L-KYN: L-kinurenina; Ac. KYN: Ácido quinurênico; 3HKYN: 3-hidroxiquinurenina.

7. DISCUSSÃO

O modelo de DM experimental por associação da administração de streptozotocina e dieta hiperlipídica (DH) ou apenas por dietas ricas em gordura tem sido amplamente utilizado nos últimos anos por apresentar características metabólicas semelhantes à de pacientes com DM2 (JELINIC et al., 2020). Estes modelos estão mais associados à hiperglicemia, obesidade e a prejuízos das funções vasculares (LIU et al., 2016) e, por esta razão, são os mais reconhecidos para se avaliar as relações propostas neste estudo.

Utilizamos dois modelos para indução de DM: associação de baixa dose de STZ e DH em fêmeas não prenhe e somente DH em fêmeas prenhe. Em ambos houve aumento da glicemia e, além disso, no grupo prenhe houve alterações no tamanho e peso da prole. De acordo com Panchal e Brown (2011), os modelos diabéticos que utilizam DH são mais representativos clinicamente. O aumento da ingestão calórica contribui para o ganho de peso e obesidade, ativação de vias pró-inflamatórias e, conseqüentemente, disfunções vasculares (TEFF et al., 2004).

O protocolo de indução de DM por STZ associada a DH, realizado por Nath, Ghosh e Sankar (2017), resulta em camundongos diabéticos com alterações significativas no perfil lipídico, na histopatologia tecidual, diminuição da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, semelhantes as características metabólicas do diabetes mellitus tipo 2.

Holemans e colaboradores (2004) evidenciaram que o consumo de DH, antes e durante a prenhez, produz um quadro semelhante ao diabetes gestacional e com diminuição da responsividade a agentes vasodilatadores. Resultados semelhantes foram encontrados por Schulze e colaboradores (2020), os quais demonstraram a DH como um modelo de diabetes gestacional em camundongos que apresenta a vantagem de integrar os fatores de risco da situação humana.

Além disso, Gohir e colaboradores (2019) demonstraram que esse modelo prejudica o desenvolvimento normal dos vasos sanguíneos na placenta, criando um ambiente inflamatório e de hipóxia. A exposição do feto a DH materna promovem um padrão de restrição de crescimento fetal (LIN et al., 2019), o qual pode estar associado

a aumento da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) nos fetos, bem como por alterações placentárias que podem levar ao desequilíbrio de várias vias metabólicas (GOHIR et al., 2019).

A via das quinureninas é uma via metabólica que desempenha importante papel tanto no quadro inflamatório (TAKADA et al., 2018), quanto na gravidez (ZARDOYA et al., 2018). Suas repercussões sobre o organismo que apresenta estes dois quadros ainda não estão bem estabelecidas. Embora a inflamação seja considerada um dos principais reguladores da expressão de IDO, já foi demonstrado que o consumo de DH também promove aumento da expressão IDO e TDO (POULAIN et al., 2013). Dessa forma, avaliamos os efeitos da inibição da IDO e da KMO sobre a função vascular de camundongos prenhe e não prenhe em condições normais e hiperglicêmicas.

Com base nas alterações da resposta vascular com a inibição de IDO e KMO e, para um melhor entendimento da via, também selecionamos três importantes metabólitos da via das quinureninas, L-Quinurenina, ácido quinurênico e 3-hidroxiquinurenina, para avaliarmos a função vascular aórtica de fêmeas em meio enriquecido com estes metabólitos nos diferentes grupos estudados.

Nossos resultados apontam que, em condições fisiológicas, a via das quinureninas aparentemente não apresenta importante ação na homeostasia vascular na artéria aorta de camundongos fêmeas. A inibição da IDO pelo 1-MT, enzima que inicia o catabolismo do triptofano em quinureninas, não promoveu alterações significativas na resposta vascular. Já a inibição da KMO diminuiu a eficácia e potência vasoconstritora da fenilefrina. A inibição da KMO resulta numa maior disponibilidade de metabolitos como L-KYN, Ac. KYN e AA, bem como reduz a síntese de 3HKYN, AX, 3HAA, AQ e AP.

Já foi demonstrado por Wang e colaboradores (2014) que o metabolismo do triptofano a partir IDO contribui para a regulação do tônus vascular através do relaxamento arterial mediado pela L-KYN, a qual ativa vias da adenilato e da guanilato ciclase. Em estudo semelhante, Sakakibara e colaboradores (2015) demonstraram que a dilatação de artérias de ratos e de humanos mediada pela L-KYN ocorre por meio de canais de potássio voltagem-dependente no músculo liso vascular.

O metabólito Ac. KYN atua como antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e colinérgico $\alpha 7$ nicotínico, cuja ação tem sido considerada neuroprotetora (SCHWARCZ & PELLICCIARI, 2002). Atua também como agonista endógeno do receptor acoplado a proteína G (GPR35) e do receptor de aril-hidrocarboneto, promovendo ação protetora na regular o tônus vascular (WANG et al., 2014), e associado a ação destes receptores, este metabólito é responsável por ações distintas.

Em estudo realizado por Badzynka e colaboradores (2014), Ac. KYN apresentou importante efeito sobre o sistema urinário de animais normais. Através do bloqueio de receptores do tipo NMDA, Ac. KYN aumentou a excreção renal ao inibir a reabsorção tubular de sódio, sendo um promissor candidato a combater a retenção de fluidos corporais e possivelmente aliviar a hipertensão. Stazka e colaboradores (2002) demonstraram que Ac. KYN também é produzida pelo endotélio vascular, porém não está muito clara sua ação direta sobre a vasculatura.

Contrapondo esses resultados, nossos dados evidenciaram que o enriquecimento com o metabólito L-KYN potencializou a resposta vasoconstritora da fenilefrina sem alterar sua eficácia e reduziu a eficácia e potência vasodilatadora da acetilcolina em animais normoglicêmicos. Ao enriquecermos com Ac. KYN, demonstramos em nossos resultados que Ac. KYN melhora a eficácia vasodilatadora, sem alterar a potência e potencializa a resposta vasoconstritora sem alterar a eficácia.

Como já foi evidenciado L-KYN e Ac. KYN atuam como agonistas do receptor de AhR (Yamamoto et al., 2019). Bravo e colaboradores (2019), observaram que a expressão diminuída desse receptor ou o seu knockout em camundongos produz níveis circulantes elevados de citocinas inflamatórias e redução da sobrevivência. Nas mesmas condições, há relatos de ocorrência de fibrose hepática e hipertrofia cardíaca (VASQUEZ et al., 2003; KAISER, PARKER & HAMRICK, 2020), sugerindo um possível mecanismo de regulação cardiovascular.

Não foram encontrados artigos que reportassem tal semelhança aos achados do presente estudo referente às ações da L-KYN. Poucos são os trabalhos que avaliaram essas respostas no organismo feminino. O efeito protetor evidenciado com a inibição da KMO no grupo não prenhe normoglicêmico pode ser um reflexo da ação conjunta

dos metabólitos L-KYN e Ac. KYN, cuja função promovida na homeostasia vascular tem sido reportada na literatura.

CHIARUGI e colaboradores (2001) evidenciaram que a ativação de monócitos decorrente de um quadro inflamatório acelera a síntese de 3HKYN e esse aumento está associado à ação neurotóxica do metabólito, levando a uma piora do quadro inflamatório. Estudo semelhante realizado por Pawlak e colaboradores (2009) sugeriram que o aumento de 3HKYN apresenta associação positiva com a inflamação e prevalência de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos e com doença renal em estágio final.

O enriquecimento do meio com 3HKYN reduziu a eficácia vasoconstritora da fenilefrina e vasodilatadora da acetilcolina em aorta de camundongos fêmeas não prenhes em meio normoglicêmico, porém potencializou ambas as respostas. 3HKYN é o metabólito precursor do ácido xanturênico (AX). De acordo com Fazio e colaboradores (2017), AX apresenta maior eficácia que a L-KYN no relaxamento de artérias de resistência de camundongos, porém com ação é diminuída em anéis aórticos pré-contraídos.

A vasodilatação induzida por AX decorre do aumento da ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial, sendo uma ação dependente do endotélio (FAZIO et al., 2017). Estudo realizado por Favennec e colaboradores (2016) demonstrou associação positiva entre os níveis de AX e a melhora do controle da glicose em pacientes diabéticos pós cirurgia bariátrica. Dessa forma, o enriquecimento de 3HKYN e consequente aumento da AX relacionado à redução da eficácia vasoconstritora da fenilefrina e aumento da potência vasodilatadora da acetilcolina evidenciados em nosso estudo.

Observamos que no grupo de animais fêmeas hiperglicêmicas, a redução da resposta vasoconstritora mediada pela inibição da KMO em condições fisiológicas é perdida. Em aorta de camundongos fêmeas hiperglicêmicas, o enriquecimento do meio com Ac. KYN potencializou a resposta vasoconstritora da fenilefrina enquanto que L-KYN e Ac. KYN reduziram a resposta vasodilatadora da acetilcolina. O enriquecimento com 3HKYN reduziu a resposta vasoconstritora e vasodilatadora quando comparados ao controle sem enriquecimento.

Esses dados podem seguir uma nova abordagem quando avaliamos essas respostas com os inibidores da IDO e da KMO. A inibição promoveu o aumento significativo da contração mediada por fenilefrina e redução da vasodilatação mediada pela acetilcolina quando comparado ao grupo hiperglicêmico na ausência dos inibidores, sendo essa resposta mais expressiva com a inibição da KMO. Esses dados sugerem que é possível que metabólitos como o AX, 3HAA e AP, não sintetizados devido a inibição da KMO, atuem no aumento da resposta da vasodilatadora e/ou diminuição da resposta vasoconstritora de vasos com metabolismo alterado pela hiperglicemia.

No processo inflamatório, característico do quadro hiperglicêmico, ocorre uma super regulação de IDO devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (SCHROECKSNADEL et al., 2006). A ativação dos receptores AhR pelos agonistas L-KYN e Ac. KYN, inibem a liberação de TNF- α por macrófagos, diminuem a inflamação e melhoram a resposta vasodilatadora (SALLÉE et al., 2014). Zhang e colaboradores (2012) evidenciaram que o aumento da inflamação vascular aumenta a probabilidade do desenvolvimento de doença aterosclerótica, e isso está associado à diminuição nos níveis de Ac. KYN.

Uma análise transcriptômica de placas carotídeas realizada na aterosclerose experimental revelou que a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de Ac. KYN é negativamente regulada e que a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de ácido quinolínico é regulada positivamente (BAUNGARTNER et al., 2020). Esses resultados evidenciam uma ação dicotômica da via das quinureninas relacionada aos genes inflamatórios e à estabilidade da placa, onde Ac. KYN apresenta ação protetora contra a inflamação e AQ apresenta ação pró-inflamatória.

Já foi evidenciado por Badawy e Guillemin (2019) que no organismo feminino, o aumento de sinalização inflamatória em associação com o envelhecimento induz o aumento do metabolismo central do triptofano em quinurenina, deslocando a via para uma maior síntese de AQ. Além do perfil pró-inflamatório associado a esse metabólito, os autores demonstraram que o AQ também está envolvido na maioria dos distúrbios neurodegenerativos relacionados a idade.

Em estudo realizado por Zhang e colaboradores (2012) foi observado que níveis aumentados de 3HAA, cujo precursor é o 3HKYN, diminuem os níveis de lipídios

plasmáticos, a inflamação vascular e placas na aterosclerose experimental por meio da modulação de vias inflamatórias como o NFκB e as vias de sinalização do inflamassoma. Orabona e colaboradores (2018) também evidenciaram que o aumento da biodisponibilidade de 3HAA circulante no paciente diabético pode modular a inflamação induzida pelo quadro hiperglicêmico, melhorando os danos causados pela hiperglicemia.

Nossos resultados demonstram um papel importante da via no quadro hiperglicêmico, ao sintetizar metabólitos com ações distintas na resposta vascular e inflamatória. Os resultados encontrados com a inibição de IDO e KMO no grupo hiperglicêmico, nos direcionam à hipótese de que a via regula ações para uma melhora do quadro inflamatório e da resposta vascular por ação metabólitos resultantes da via L-KYN/KMO e/ou por uma ação sinérgica de Ac. KYN e L-KYN, sobrepondo os danos inflamatórios e vasculares causados por metabólitos como o AQ.

Já está bem documentado que durante a gestação saudável a demanda por TRP em corpos maternos e embrionários aumenta para promover a regulação da tolerância materno-fetal (KEATON et al., 2019). O aumento do catabolismo do TRP placentário pela IDO leva à inibição da proliferação de células T, impedindo assim a rejeição do tecido fetal pelo sistema imunológico materno (BAN et al., 2013).

Outra importante alteração no organismo materno para o desenvolvimento da gestação saudável é o desenvolvimento de adaptações hemodinâmicas que evitam uma sobrecarga no sistema cardiovascular materno e promovem o desenvolvimento adequado do feto e gestação (TARANIKANTI, 2018). Estas alterações decorrem de uma série de mecanismos endócrinos e vasculares que resultam em diminuição da resistência vascular periférica (MYATT & WEBSTER, 2009).

O endotélio vascular exerce importante papel nestas adaptações hemodinâmicas observadas na gravidez, sendo o NO o principal vasodilatador produzido pelo endotélio (XIAO, PEARCE & ZHANG, 2001). Wang e colaboradores (2010) reportaram que a síntese de quinurenina endotelial contribui para o relaxamento de vasos arteriais e com o controle da pressão arterial, principalmente em condições inflamatórias (WANG et al., 2010).

Em nossos resultados, a inibição da IDO e da KMO em fêmeas ao final da prenhez resultou em aumento da resposta vasoconstritora e diminuição da resposta vasodilatadora, sendo a resposta mediada pela inibição da IDO mais significativa. Esses resultados demonstram a importância da via não somente no desenvolvimento da tolerância materno-fetal, mas como importante reguladora vascular no organismo materno.

Ao enriquecermos o meio com os metabólitos da via, Ac. KYN e 3HKYN promoveram diminuição da resposta vasopressora da fenilefrina, porém, sem promover melhora na resposta vasodilatadora da acetilcolina. Já no grupo prenhe hiperglicêmico, a L-KYN foi o único metabólito avaliado que promoveu redução da resposta vasoconstritora, também sem melhorar a resposta vasodilatadora.

Ao inibir a via, somente o inibidor da KMO promoveu uma expressiva redução da resposta vasoconstritora, demonstrando que o aumento da biodisponibilidade de metabólitos como L-KYN e Ac. KYN, decorrente do inibidor é importante na diminuição da resposta vasopressora característica do final da prenhez.

Até o momento, pouco se conhece o papel da via sobre a vasculatura na diabetes gestacional, mas na pré-eclâmpsia, patologia gestacional associada a um perfil inflamatório, foi demonstrado que o relaxamento vascular mediado pelo catabolismo do TRP em L-KYN é mantido (BROEKHUIZEN et al., 2020). Em estudo de reatividade vascular em diferentes vasos sanguíneos de mulheres grávidas e com gravidez pré-eclâmptica, a L-KYN mostrou-se um potente vasodilatador dependente do endotélio e se mantém preservado na pré-eclâmpsia (WORTON et al., 2021).

Ac. KYN parece desempenhar um importante papel imunorregulador por meio da ativação de receptores que inibem liberação de IL-4 (FALLARINI et al., 2010) e produção de TNF- α (TISZLAVICZ et al., 2011), controlando processos inflamatórios em diferentes condições, incluindo esquizofrenia, osteoporose, epilepsia e esclerose lateral amiotrófica e doenças cardíacas (CHEN & GUILLEMIN, 2009). Em estudo recente, MILART e colaboradores (2019) demonstrou que Ac. KYN pode influenciar o metabolismo, reduzir o ganho de peso e controlar a obesidade, sendo um outro mecanismo regulador da inflamação.

A quinurenina, após sintetizada, pode originar vários metabólitos ativos, como Ac. KYN, AA e 3HKYN, e a partir do 3HKYN pode ser formado AX e 3HAA. A via 3HAA pode resultar em AP e AQ, o qual forma NAD⁺, esse perfil de ativação é definido pelas enzimas que catabolizam a quinurenina e seus metabólitos. Em estudo realizado por Wang e colaboradores (2014), foi demonstrado que a ativação de NAD(P)H oxidase originada a partir do catabolismo do L-KYN/3HKYN aumenta as concentrações de ROS e acelera apoptose das células endoteliais, resultando num quadro de disfunção endotelial in vivo.

A incubação dos vasos arteriais com 3HKYN foi responsável por uma diminuição da resposta vasoconstritora em todos os grupos avaliados, exceto o grupo prenhe hiperglicêmico. Esses dados sugerem que a definição do ramo mais ativo da via é definido pelo perfil de ativação enzimática e aparentemente, esse perfil sofre alterações conforme o quadro apresentado pelo organismo.

Dessa forma, acreditamos que avaliar a expressão dessas enzimas nos diferentes grupos estudados, principalmente as enzimas do ramo L-KYN/3HKYN pode contribuir para um melhor entendimento sobre a via e os mecanismos envolvidos em diferentes estados fisiológicos e patológicos.

Os metabólitos AA e 3HAA são sintetizados a partir da L-KYN e 3HKYN, respectivamente, por ação da enzima quinureninase (KYNU). Já foi demonstrado que os níveis de AA foram significativamente mais elevados em mulheres que desenvolveram DMG (LEWIS et al., 2015). Há evidências de que a diminuição nos níveis de 3HAA e o aumento nos níveis de AA estão diretamente associados com distúrbios neurológicos e doenças cardíacas. Nessa situação, o aumento de AA seria uma resposta para diminuir os danos primários e secundários causados pela progressão do processo inflamatório envolvido nessas patologias (DARLINGTON et al., 2010).

O catabolismo de 3HAA, pela enzima 3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase (3HAO), resulta na biossíntese de AQ e NAD⁺ (FUJIGAKI, YAMAMOTO & SAITO 2017), ambos associados com o desenvolvimento da disfunção endotelial (WANG et al., 2014). Darlington e colaboradores (2010) demonstraram que o aumento de AA inibe a ação da 3HAO na conversão do 3HAA em AQ, descrito como um mecanismo

compensatório para reduzir a toxicidade celular causada por estes metabólitos oriundos da via.

De acordo com Sahm e colaboradores (2013), 3HAO pode ser alvo para futuras abordagens terapêuticas para doenças inflamatórias. Em estudos pré-clínicos realizados por Berg e colaboradores (2020), os autores demonstraram que a inibição de 3HAO reduz a carga da lesão aterosclerótica, além de reduzir níveis de colesterol e triglicerídeos hepáticos e os lipídios plasmáticos. Em contrapartida, com o bloqueio de 3HAO, o aumento de 3HAA inibiu a ativação do inflamassoma e a secreção de IL-1 β por macrófagos, sendo um importante regulador de processos inflamatórios.

Neste estudo, foi evidenciado que a via das quinureninas proveniente do metabolismo do TRP apresenta múltiplas funções importantes no organismo. Um crescente número de estudos vem sendo realizados para esclarecer a dicotomia existente no que se entende atualmente sobre a ação dessa via no organismo normal e gravídico, bem como sua relação em alterações patológicas como o diabetes, distúrbios metabólicos e complicações cardiovasculares.

Um número relevante de dados publicados na literatura aponta a via das quinureninas como uma resposta compensatória mediante a uma inflamação instalada, cuja ativação seria voltada para reduzir a inflamação, bem como os danos causados por ela (BERG et al., 2020). Sua função seria a de regular vias metabólicas e desencadear efeitos protetores em patologias como diabetes e suas complicações, pré-eclâmpsia e doenças infecciosas (BARDGETT, MCCARTHY & STOCKER, 2010 IWAHASHI et al., 2017).

No entanto, devido aos diversos metabólitos produzidos pela ativação da via, outro número relevante de dados publicados reporta que a via das quinureninas são importantes cofatores que levam ao desenvolvimento do quadro inflamatório (KONJE et al., 2021). E com o quadro inflamatório instalado, passam a atuar de forma mais expressiva no desenvolvimento e piora de patologias neurodegenerativas e cardiovasculares (Song et al., 2017).

Nossos resultados sustentam a hipótese de uma ação reguladora relacionada a homeostasia vascular em condições fisiológicas, bem como na condição gravídica, devido a ação agonista de metabólitos como L-KYN e Ac. KYN sobre receptores que regulam o tônus vascular. Já no quadro hiperglicêmico instalado no organismo

feminino, esses metabólitos parecem perder seus efeitos protetores, porém é possível que outros metabólitos ativos da via, como o 3HAA e AX, possam ser requeridos para desencadear esse efeito protetor, uma vez que a inibição da via aumentou a resposta vasoconstritora.

8. CONCLUSÕES

Nosso estudo evidenciou, através de duas revisões sistemáticas da literatura, que o catabolismo do triptofano pela enzima IDO desempenha importante papel imunossupressor na interface materno-fetal. Suportando a hipótese de uma forte associação da diminuição da ativação da via com pré-disposição de um maior risco de aborto espontâneo, restrição de crescimento fetal e/ou pré-eclâmpsia.

No quadro diabético, nossas análises metanalíticas evidenciaram que, mesmo os dados dos estudos não sendo suficientes para entender os mecanismos envolvidos, ocorre um aumento significativo da depleção do triptofano pela enzima IDO em paciente diabético. Os metabólitos da quinurenina oriundos da ativação da via indicam uma forte associação com o desenvolvimento do quadro diabético e suas complicações.

Com uma terceira revisão sistemática realizada sobre estudos experimentais abrangendo os diferentes modelos de protocolos de indução de DM2, foi possível definirmos o modelo que utiliza baixa dose de estreptozotocina associada a DH como mais adequado para produzir mudanças uniformes e significativas na função endotelial e resultados de melhor qualidade e mais facilmente comparáveis entre si e relacionados às alterações observadas em estudos de disfunção vascular em humanos.

Em nosso estudo experimental, evidenciamos que a via das quinureninas desempenha importante ação na regulação do tônus vascular mais voltada para a diminuição da resposta vascular ao vasoconstritor fenilefrina. Além disso, evidenciamos também que o perfil de resposta dos metabólitos da via difere nos grupos avaliados.

A L-quinurenina foi efetiva na redução da vasoconstrição mediada pela fenilefrina na prenhez hiperglicêmica, condição em que ocorre aumento de fatores vasoconstritores no organismo materno. O ácido quinurênico foi mais importante na prenhez normoglicêmica também por reduzir a resposta vasoconstritora, além de aumentar a Emax de animais não prenhe normoglicêmicas.

O ácido 3-hidroxiquinurenina, bastante estudado por seus efeitos deletérios no sistema neurológico, também reduziu a resposta máxima constritora nos grupos prenhe e não prenhe normoglicêmicas, além de potencializar a resposta vasodilatadora no grupo não prenhe normoglicêmicas.

Os resultados obtidos a partir da inibição da via com o inibidor da IDO e da KMO, sugerem que outros metabólitos originados a partir do catabolismo do triptofano, tais como ácido xanturênico, ácido antranílico e 3-hidroxi-antranílico, não avaliados neste estudo, podem estar estreitamente relacionados com os mecanismos envolvidos na regulação da resposta vascular nos diferentes grupos analisados neste estudo.

9. EQUIPE CIENTÍFICA

Nome	Instituição e formação acadêmica	Função
Nayana Yared Batista	UFAM, Bióloga, Mestre em Ciências Farmacêuticas	Doutoranda
José Wilson do Nascimento Corrêa	UFAM, Farmacêutico, Doutor em Farmacologia	Orientador
Rita de Cássia Passaglia Tostes	USP, Farmacêutica, Doutora em Ciências Biológicas	Co-orientadora
Pritesh Jaychad Lalwani	UFAM, Ciências Biológicas - Biotecnologia, Doutor em Imunologia	Colaborador
Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes	UFAM, Médico Reumatologista, Doutor em Biotecnologia	Colaborador
Emerson da Silva Lima	UFAM, Farmacêutico, Doutor em Farmácia	Colaborador
Kadmiel Cândido	UFAM, Enfermeiro, Mestre em Imunologia Básica e Aplicada	Colaborador
Everton de Oliveira Pinto	UFAM, Enfermeiro	Colaborador
Sandra Barros de Oliveira	UFAM, Graduanda em Farmácia	Colaboradora

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v.37, p.S81-S90, 2014.
- BATISTA, P.R. Upregulation do receptor tipo Toll 4 pela angiotensina II contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio. 2014. 220 f. Tese (**Doutorado em Ciências Fisiológicas**) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.
- BAUMGARTNER, R. et al. Evidence that a deviation in the kynurenine pathway aggravates atherosclerotic disease in humans. **Journal of Internal Medicine**, 2020.
- BADAWY, A.A.B.; NAMBOODIRI, A.M.A.; MOFFETT, J.R. The end of the road for the tryptophan depletion concept in pregnancy and infection. **Clin. Sci.** v.130, p.1327–1333, 2016.
- BADAWY, A.A.B.; GUILLEMIN, G. The plasma [kynurenine]/[tryptophan] ratio and indoleamine 2, 3-dioxygenase: time for appraisal. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 12, p. 1178646919868978, 2019.
- BĄDZYŃSKA, B. et al. Effects of systemic administration of kynurenic acid and glycine on renal haemodynamics and excretion in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **European journal of pharmacology**, v. 743, p. 37-41, 2014.
- BAUMGARTNER, R. et al. Evidence that a deviation in the kynurenine pathway aggravates atherosclerotic disease in humans. **Journal of Internal Medicine**, 2020.
- BARDGETT, M.E.; MCCARTHY, J.J.; STOCKER, S.D. Glutamatergic receptor activation in the rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoexcitatory response to hyperinsulinemia. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 284-290, 2010.
- BERG, M. et al. 3-Hydroxyanthranilic acid metabolism controls the hepatic SREBP/lipoprotein axis, inhibits inflammasome activation in macrophages, and decreases atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice. **Cardiovascular research**, v. 116, n. 12, p. 1948-1957, 2020.
- BERTOLUCI, M.C; CÉ, G.V.; SILVA, A.M.V.; PUÑALES, M.K.C. Disfunção Endotelial no Diabetes Mellito Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.52(2), p.416-26, 2008.
- BRAVO-FERRER, I. et al. Lack of the aryl hydrocarbon receptor accelerates aging in mice. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 11, p. 12644-12654, 2019.
- BROEKHUIZEN, M. et al. I-Tryptophan-Induced Vasodilation Is Enhanced in Preeclampsia: Studies on Its Uptake and Metabolism in the Human Placenta. **Hypertension**, v. 76, n. 1, p. 184-194, 2020.
- CHEN, Y.; GUILLEMIN, G. J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, p. IJTR. S2097, 2009.
- CORREIA, S.C. et al. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. **Brain research**, v. 1441, p. 64-78, 2012.
- DARLINGTON, L. Gail et al. On the biological importance of the 3-hydroxyanthranilic acid: anthranilic acid ratio. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 3, p. IJTR. S4282, 2010.
- DE BIE, J. et al. Central kynurenine pathway shift with age in women. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 5, p. 995-1003, 2016.
- FALLARINI, Silvia et al. Expression of functional GPR35 in human iNKT cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 398, n. 3, p. 420-425, 2010.
- FAVENNEC, M. et al. Post-bariatric surgery changes in quinolinic and xanthurenic acid concentrations are associated with glucose homeostasis. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0158051, 2016.

FAZIO, F. et al. Vasorelaxing action of the kynurenine metabolite, xanthurenic acid: the missing link in endotoxin-induced hypotension?. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 214, 2017.

FUJIGAKI, H; YAMAMOTO, Y.; SAITO, K. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: focus on cell type differences. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 264-274, 2017.

GOHIR, W. et al. High-fat diet intake modulates maternal intestinal adaptations to pregnancy and results in placental hypoxia, as well as altered fetal gut barrier proteins and immune markers. **The Journal of physiology**, v. 597, n. 12, p. 3029-3051, 2019.

GROZDICS, E. et al. B7 co-stimulation and intracellular indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

HOLEMANS, K. et al. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 190, n. 3, p. 858-865, 2004.

HUANG, L.; BABAN, B.; JOHNSONIII, B. A.; MELLOR, A. L. Dendritic cells, indoleamina 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. **Int. Rev. Immunol.** v. 22 (9), 2013.

IWAHASHI, N. et al. Downregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in the villous stromal endothelial cells of placentas with preeclampsia. **Journal of reproductive immunology**, v. 119, p. 54-60, 2017

KING, N.J.C; THOMAS, S.R. Molecules in focus: indoleamine 2, 3-dioxygenase. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2007.

LAHOZA, C.; MOSTAZAA, J.M. Atherosclerosis as a systemic disease. **Rev EspCardiol.** v.60, p.184-95, 2007.

JELINIC, M. et al. The vascular consequences of metabolic syndrome: rodent models, endothelial dysfunction and current therapies. **Front Pharmacol.** v.11, p.148, 2020.

KAISER, H.; PARKER, E.; HAMRICK, M.W. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: Implications for aging and healthspan. **Experimental gerontology**, v. 130, p. 110797, 2020.

KEATON, S.A. et al. Altered tryptophan catabolism in placentas from women with pre-eclampsia. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 12, p. 1178646919840321, 2019.

KONJE, V.C. et al. Tryptophan levels associate with incident cardiovascular disease in chronic kidney disease. **Clinical kidney journal**, v. 14, n. 4, p. 1097-1105, 2021.

LEWIS, R. B. et al. Metabolomic profiling in the prediction of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 58, n. 6, p. 1329-1332, 2015.

LIN, Y.J. et al. A dieta materna com alto teor de gordura altera especificamente a morfologia placentária e o transcriptoma em ratos: avaliação por sequenciamento de última geração. **Placenta**, v. 78, p. 44-53, 2019.

LIU, C.Y. et al. Metabolic damage presents differently in young and early-aged C57BL/6 mice fed a high-fat diet. **International Journal of Gerontology**, v. 10, n. 2, p. 105-111, 2016.

MILART, P. et al. Kynurenic acid as the neglected ingredient of commercial baby formulas. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

SAHM, Felix et al. The endogenous tryptophan metabolite and NAD⁺ precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress. **Cancer research**, v. 73, n. 11, p. 3225-3234, 2013.

MONTES, G.S.; LUQUE, E.H. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. **Acta. Anat.** v.133, P.192-9, 1988.

MULVANY, M.J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**, v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977.

NATH, S.; GHOSH, S.K.; CHOUDHURY, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 84, p. 20-30, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil**. Brasília, DF: OPAS, 2016.

PETERS, J.C. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 294, p. 58-345, 1991.

ORABONA, C. et al. Deficiency of immunoregulatory indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 in juvenile diabetes. **JCI insight**, v. 3, n. 6, 2018.

PANCHAL, S.K.; BROWN, L. Rodent models for metabolic syndrome research. **J Biomed Biotech**. 2010; 2011.

PAWLAK, K. et al. The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 1, p. 309-314, 2009.

POLYZOS, K.A.; KETELHUTH, D.F. The role of the quinurenina pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. **An emerging field. Hamostaseologie**.;v35 (2), p.128-36, 2015.

POULAIN-GODEFROY, O. et al. Induction of TDO2 and IDO2 in liver by high-fat feeding in mice: discrepancies with human obesity. 2013.

SAKAKIBARA, K. et al. Kynurenine causes vasodilation and hypotension induced by activation of KCNQ-encoded voltage-dependent K⁺ channels. **Journal of pharmacological sciences**, v. 129, n. 1, p. 31-37, 2015.

SAHM, Felix et al. The endogenous tryptophan metabolite and NAD⁺ precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress. **Cancer research**, v. 73, n. 11, p. 3225-3234, 2013.

SALLÉE, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 934-949, 2014.

SCHRÖCKSNADEL, K. et al. Longitudinal study of tryptophan degradation during and after pregnancy. **Life Sci**. v.72, p.785–793, 2003.

SCHROECKSNADEL, K. et al. Crucial role of interferon- γ and stimulated macrophages in cardiovascular disease. **Current vascular pharmacology**, v. 4(3), p. 205-213, 2006.

SCHULZE, F. et al. Inhibition of IL-1 β improves Glycaemia in a Mouse Model for Gestational Diabetes. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

SCHWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 1, p. 1-10, 2002.

SONG, P. et al. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2899-2916, 2017

STAŹKA, J. et al. Endothelium-dependent production and liberation of kynurenic acid by rat aortic rings exposed to L-kynurenine. **European journal of pharmacology**, v. 448, n. 2-3, p. 133-137, 2002.

TAKADA, A. et al. Measurement of tryptophan metabolites in healthy old men and patients of type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Food and Nutrition Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1206-1220, 2018.

TARANIKANTI, M. Physiological changes in cardiovascular system during normal pregnancy: a review. **Indian Journal of Cardiovascular Disease in Women WINCARS**, v. 3, n. 02/03, p. 062-067, 2018.

TATSUMI, K. et al. Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.274, p.166–170, 2000.

TEFF, K.L. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab.** v.89(6), p.2963-2972, 2004.

TISZLAVICZ, Zoltán et al. Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor- α (TNF- α) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 383, n. 5, p. 447-455, 2011.

VASQUEZ, A. et al. A role for the aryl hydrocarbon receptor in cardiac physiology and function as demonstrated by AhR knockout mice. **Cardiovascular toxicology**, v. 3, n. 2, p. 153-163, 2003.

WANG, Y. et al. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nature medicine**, v. 16, n. 3, p. 279-285, 2010.

WANG, Q. et al. Activation of NAD (P) H oxidase by tryptophan-derived 3-hydroxykynurenine accelerates endothelial apoptosis and dysfunction in vivo. **Circulation research**, v. 114, n. 3, p. 480-492, 2014.

WORTON, S.A. et al. Kynurenine Relaxes Arteries of Normotensive Women and Those With Preeclampsia. **Circulation research**, v. 128, n. 11, p. 1679-1693, 2021.

YAMAMOTO, T. et al. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. **Science signaling**, v. 12, n. 587, 2019.

YUASA, H.J.; BALL, HJ. The evolution of three types of indoleamine 2, 3 dioxygenases in fungi with distinct molecular and biochemical characteristics. **Gene**. v. 504, n. 1, p. 64-74, 2012.

ZHANG, L. et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lowers plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice. **European heart journal**, v. 33, n. 16, p. 2025-2034, 2012. ZARDOYA-LAGUARDIA, P. et al. Endothelial indoleamine 2, 3-dioxygenase-1 regulates the placental vascular tone and is deficient in intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

ZONG, S. et al. Dysregulated expression of IDO may cause unexplained recurrent spontaneous abortion through suppression of trophoblast cell proliferation and migration. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

ANEXOS

Anexo 1 - Artigo: Relationship between metabolites levels of the kynurenine pathway and type 2 diabetes mellitus: results from a meta-analysis. (Comprovante de submissão)

16/07/2021

Yahoo Mail - Your manuscript submission - 736004

Your manuscript submission - 736004

De: Frontiers in Physiology (physiology.editorial.office@frontiersin.org)

Para: nanyared@yahoo.com.br

Data: domingo, 4 de julho de 2021 03:07 BRT

Dear Dr Batista

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "METABOLITES LEVELS OF THE KYNURENINE PATHWAY IN TYPE DIABETES MELLITUS: RESULTS FROM A META-ANALYSIS" to be considered for publication in Frontiers in Physiology, section Metabolic Physiology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best regards,

Your Frontiers in Physiology Team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
 www.frontiersin.org
 Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005 Lausanne, Switzerland
 Office T 41 21 510 1789

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: METABOLITES LEVELS OF THE KYNURENINE PATHWAY IN TYPE DIABETES MELLITUS: RESULTS FROM A META-ANALYSIS

Manuscript ID: 736004

Authors: Nayana Yared Batista, Everton de Oliveira Pinto, Felipe Rodolfo Pereira da Silva, Alessandro Luiz Araújo Bentes Leal, Alcenir de Carvalho Maquiné, Peterson Carvalhal Sousa, Rita C Tostes and José Wilson Do Nascimento Corrêa

Journal: Frontiers in Physiology, section Metabolic Physiology

Article type: Systematic Review

Submitted on: 04 Jul 2021

Research Topic: Metabolism and Vascular Diseases

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=2506&name=metabolic_physiology

Anexo 2 - Artigo: Methodological evaluation of vascular dysfunction in diabetes type 2 model: a Systematic Review (Comprovante de submissão)

16/07/2021

Yahoo Mail - Journal of Evidence-Based Medicine - Manuscript ID JEBM-2020-08-083.R2 [email ref: SE-8-a]

Journal of Evidence-Based Medicine - Manuscript ID JEBM-2020-08-083.R2 [email ref: SE-8-a]

De: BMJ Evidence-Based Medicine (onbehalf@manuscriptcentral.com)

Para: jwcorrea@ufam.edu.br

Cc: nanyared@yahoo.com.br; everton.oliveira-@hotmail.com; feliperodolfo.15@hotmail.com; alessandroluisaraujo@gmail.com; silvania_furtado@yahoo.com.br; fmarques123@gmail.com; jwcorrea@ufam.edu.br

Data: quinta-feira, 29 de abril de 2021 15:44 BRT

29-Apr-2021

Dear Prof. Corrêa:

Your revised manuscript entitled "VASCULAR DYSFUNCTION IN EXPERIMENTAL MODELS OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN RATS: A SYSTEMATIC REVIEW" by Batista, Nayana; Pinto, Everton; da Silva, Felipe; Leal, Alessandro; Furtado, Silvania; Barcellos, Fernando; Corrêa, José Wilson, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Evidence-Based Medicine.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JEBM-2020-08-083.R2.

For your reference: the manuscript number of the PREVIOUS manuscript version is: JEBM-2020-08-083.R1.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/journalebm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/journalebm>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Evidence-Based Medicine.

Sincerely,
Journal of Evidence-Based Medicine Editorial Office

Anexo 3 – Premiação no V Simpósio Biologia Vascular

Acesse <https://doi.org/10.1007/978-95-021-0000-0> para verificar se este certificado é válido



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado “Effects Of the kynurenine pathway on the vascular function of late pregnant mice” de autoria de Nayana Yared Batista, Everton de Oliveira Pinto, Alecsander Fabricio M. Bressan, Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia e José Wilson do Nascimento Corrêa recebeu **menção honrosa** entre os melhores trabalhos da modalidade Vídeo-pôster do V Simpósio de **Biologia Vascular**, realizado on-line, durante o período de 24 a 26 de fevereiro de 2021.



Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da comissão organizadora



Anexo 4 - Guia de acompanhamento para melhor compreensão dos resultados.

		Vasoconstrição					Vasodilatação				
		1-MT	IKMO	LKYN	Ac. KYN	3HKYN	1-MT	IKMO	LKYN	Ac. KYN	3HKYN
Não prenhe (Normo)	E _{max}	=	↓	=	=	↓	=	=	↓	↑	↓
	pD ₂	=	↓	↑	↑	↑	=	=	↓	=	↑
Não prenhe (Hiper)	E _{max}	↑	↑	=	=	=	↓	↓	↓	=	↓
	pD ₂	=	=	=	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Prenhe (Normo)	E _{max}	↑	↑	=	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓
	pD ₂	=	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Prenhe (Hiper)	E _{max}	=	↓	↓	=	=	↑	=	↓	=	=
	pD ₂	=	↓	↑	=	=	↓	↓	↓	↓	↓

↓: diminuição da resposta em comparação ao controle;

↑: aumento da resposta em comparação ao controle;

=: sem diferença estatística em relação ao controle.

Anexo 5 - Aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comitê de Ética no Uso de Animais
Departamento de Patologia e Imunologia

FMRP
65 anos USP

AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *"Influência da via das quinureninas na função vascular de ratos grávidas e não grávidas em modelo experimental de diabetes"*, registrado com o número do protocolo 167/2019, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rita de Cassia Alcino Tostes Passaglia, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de novembro de 2019.

Colaboradora: Nayana Yared Batista

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade		<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica		
Vigência da autorização		25/11/2019 a 31/01/2020		
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/idade	Sexo	Origem
Rato / Sprague-Dawley	120	200g / 42 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
Rato / Sprague-Dawley	09	200g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 25 de novembro de 2019

Prof. Dra. Katúcia Uzzan Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP