

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA



TESE DE DOUTORADO

**IMPACTO DA HIPERGLICEMIA GESTACIONAL SOBRE
O PADRÃO MORFOFUNCIONAL CARDÍACO DA PROLE
ADULTA**

ODAIR ALVES DA SILVA

Orientadora: Prof^a. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

RECIFE, 2016

ODAIR ALVES DA SILVA



**IMPACTO DA HIPERGLICEMIA GESTACIONAL SOBRE
O PADRÃO MORFOFUNCIONAL CARDÍACO DA PROLE
ADULTA**

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do
título de Doutor em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade Federal de
Pernambuco

ORIENTADORA:

Prof^a. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

RECIFE, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Odair Alves da
Impacto da hiperglicemia gestacional sobre o padrão morfofuncional
cardíaco da prole adulta/ Odair Alves da Silva– Recife: O Autor, 2016.

94 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências

- 1. Diabetes na gravidez 2. Insuficiência cardíaca 3. Feto I. Duarte,
Glória Isolina Boente Pinto (orientadora) II. Título**

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-181

Odair Alves da Silva

“Impacto da hiperglicemia gestacional sobre o padrão morfofuncional
cardíaco da prole adulta”

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção
do título de Doutor em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade Federal
de Pernambuco

Aprovado por:

Prof^ª. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte - Presidente

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou

Prof^ª. Dra. Luiza Antas Rabelo

Prof. Dr. Dalton Valentin Vassallo

Data: 27/02/2015

AGRADECIMENTOS

À Prof^a **Glória Isolina Boente Pinto Duarte**, pela orientação e por todo conhecimento e dedicação dispensados. Minha gratidão.

Aos Professores **Fabiano Elias Xavier** e **Mohammed Saad Lahlou**, pelo exemplo de pesquisador a ser seguido e pela coparticipação imprescindível na realização desse trabalho e de meus objetivos pessoais.

À Profa. **Cristina de Oliveira** e **Alexandre Descomps**, pela amizade, incentivo e ajuda imprescindível.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, e de Reatividade Vascular: **Diego de Queiroz, Fernanda Elizabethe, Geórgia Félix, Geórgia Leal, Hicla Moreira, Jean Pereira, José Jairo, Juliana Dantas, Juliana Rocha, Leylliane Interaminense, Luciana Veloso, Marcelo Rocha, Thayane Rebeca**, pela amizade, companheirismo e ajuda durante os experimentos.

Ao secretário do PPGBF: **Djalma Silva** pela imensa simpatia e prontidão em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial a **Sr. Márcio Pires, Sr. Edvaldo Mendes**, pela enorme ajuda proporcionada.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica, e de Fisiologia e Farmacologia, que, certamente, foram imprescindíveis para a minha formação acadêmica.

Ao técnico do laboratório, **Sr. José Antônio Albuquerque** e a veterinária **Cláudia Oliveira**, por todo apoio, amizade e colaboração técnica.

Minha gratidão e meu respeito aos **ANIMAIS DE LABORATÓRIO**, por tornar a ciência teórica uma realidade prática.

Pelo apoio financeiro: **CNPq, FACEPE - CNPq/Pronex**.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho, meu eterno **OBRIGADO!**

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

[Francisco de Assis]

"Os obstáculos existem por algum motivo. Não estão ali para nos impedir de entrar. Eles existem para nos mostrar as forças de nossas aspirações."

[Randy Pausch]

Resumo

Resumo

Introdução: O diabetes gestacional é um estado patológico que aumenta a incidência de complicações tanto para a mãe quanto para o feto. Dessa forma, a prole exposta a um ambiente fetal adverso pode apresentar susceptibilidade a doenças crônicas mais tarde na vida adulta, incluindo anormalidades cardiovasculares e metabólicas, as quais, aumentam o risco de morte prematura. No presente estudo, foram avaliados parâmetros metabólicos, biométricos e cardiovasculares em três idades diferentes na prole de ratas com diabetes *mellitus*. **Métodos:** O diabetes foi induzido em ratas Wistar ao dia 7 de gestação através de uma dose única de estreptozotocina (50 mg/kg) administrada por via intraperitoneal. A prole de mães controles (OC) e de mães diabéticas (OD) foi avaliada em três idades diferentes: 6, 12 ou 18 meses. A glicemia de jejum, o crescimento e a composição corporal foram avaliados. A pressão arterial basal e a função cardíaca foram avaliadas em ratos conscientes (por cateterismo arterial e ventricular). A função cardíaca também foi avaliada *in vitro* (através do experimento de coração isolado). A resposta barorreflexa à fenilefrina (FEN) ou nitroprussiato de sódio (NPS) foi determinada pelo método de regressão linear. A Influência simpática e parassimpática sobre o coração foi avaliada por bloqueio autonômico. O índice de hipertrofia ventricular foi determinado pelo peso seco dos ventrículos em relação ao peso do corpo. **Resultados:** A glicemia de jejum, a pressão arterial média e o tônus simpático estiveram elevados nos ratos OD com 12 (OD12) e com 18 meses de idade (OD18), quando comparados com os ratos OC de mesma idade. Os animais do grupo OD também mostraram deficiência no controle barorreflexo da frequência cardíaca, com menor resposta taquicárdica e inotrópica após administração de NPS. O efeito bradicárdico evocado pela FEN esteve também reduzido no grupo OD18. Durante a avaliação da função cardíaca *in vivo*, foi observado uma menor pressão sistólica do ventrículo esquerdo e uma menor $+dP/dT$ nos ratos OD18, mostrando disfunção sistólica. Em todos os grupos OD foi observada alta pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e baixo $-dP/dT$, mostrando uma disfunção diastólica. Todos os ratos do grupo OD também apresentaram índice elevado de hipertrofia ventricular e diminuição do peso relativo dos rins. Além disso, os ratos OD com mais de 12 meses apresentaram maior acúmulo de gordura abdominal e diminuição da sensibilidade cardíaca ao isoproterenol. **Conclusões:** O presente estudo demonstra que o diabetes gestacional pode induzir ao aparecimento de hiperglicemia, hipertensão e insuficiência cardíaca em idade mais avançada da prole, o que são fatores de risco importantes para a morte prematura. Portanto, é de extrema importância um controle glicêmico ideal na gravidez diabética como chave para prevenir doenças cardiovasculares na idade mais avançada da prole.

Palavras-chave: Programação fetal, Prole adulta, Função autonômica, Hiperglicemia, Insuficiência cardíaca.

Abstract

Abstract

Introduction: The Gestational diabetes is a condition that increases the incidence of complications for mother and fetus. Thus, the offspring exposed to an adverse fetal environment can present susceptibility to chronic diseases later in adulthood, including cardiovascular and metabolic abnormalities, which increase the risk of premature death. In the present study, we evaluated the metabolic, biometric and cardiovascular parameters in three different ages of rats from diabetic mothers. **Methods:** Diabetes was induced in female Wistar rats at day 7 of gestation with a single dose of STZ (50 mg / kg). The offspring from controls mothers (OC) and diabetic mothers (OD) was evaluated at three different ages: 6, 12 or 18 months. Fasting glucose, growth and body composition were evaluated. Cardiac function was assessed in conscious rats (ventricular catheterization) and *in vitro* (in the isolated heart experiment). The baroreflex response to phenylephrine (PHE) or sodium nitroprusside (SNP) was determined by linear regression. Sympathetic and parasympathetic influences on the heart were evaluated by autonomic blockade. The ventricular hypertrophy index was determined by dry weight of the ventricles. **Results:** Fasting glucose, mean blood pressure and sympathetic tone was elevated in OD rats with 12 (OD12) and 18 months (OD18) compared with age-matched OC rats. The OD subgroups showed baroreflex impairment, with lower tachycardic and inotropic response after administration of SNP. The bradycardic evoked by PHE was also reduced in OD18 group. During the evaluation of cardiac function *in vivo*, was observed a lower systolic pressure and lower +dP/dt in OD18 rats, showing a systolic dysfunction. All OD groups showed high end-diastolic pressure in the left ventricle and low -dP/dT, showing a diastolic dysfunction. These rats also presented ventricular hypertrophy and lower relative kidney weight. The OD rats over 12 months showed greater accumulation of abdominal fat than controls. The isolated hearts of OD12 and OD18 showed a decreased sensitivity to isoproterenol. **Conclusions:** This study demonstrates that gestational diabetes may induces hyperglycemia, hypertension and heart failure in older offspring, which are important risk factors for premature death. Therefore, it is of utmost importance optimal glycemic control in diabetic pregnancy as key to preventing cardiovascular disease in older offspring.

Keywords: Fetal programming, Adult offspring, Autonomic function, Hyperglycemia, Heart failure.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1	PROGRAMAÇÃO FETAL.....	15
2.2	HIPERGLICEMIA NA GRAVIDEZ.....	17
2.3	CONSEQUÊNCIAS DA HIPERGLICEMIA MATERNA SOBRE A PLACENTA E A PROLE	20
2.3.1	Alterações placentárias	21
2.3.2	Efeitos imediatos do diabetes materno sobre a prole	22
2.3.3	Efeitos tardios do diabetes materno sobre a prole	25
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	GERAL	36
3.2	ESPECÍFICOS	36
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
5	ARTIGO 1	50
6	ARTIGO 2	72
7	CONCLUSÕES.....	94

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As consequências sociais e econômicas do diabetes *mellitus* (DM) são devastadoras: aproximadamente 4 milhões de mortes por ano são atribuídas à esta doença e suas complicações, o que representa mais de 6% da mortalidade mundial (ROGLIC e UNWIN, 2010). Tais consequências do DM não estão restritas apenas aos seus portadores, mas também podem incidir sobre sua prole. Filhos de mães diabéticas apresentam risco elevado para vários distúrbios na vida adulta, incluindo o próprio diabetes (SIMEONI e BARKER, 2009).

Apesar dos avanços em seu rastreamento e prevenção, o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) ainda é o problema metabólico mais comum da gestação, com uma prevalência que pode chegar a 25% das gestações, dependendo do grupo étnico, da população e do critério diagnóstico utilizado (SACKS *et al.*, 2012). No Brasil, estima-se uma prevalência de 2,4% a 7,2% para o DMG (SBEM, 2006). Esse tipo de diabetes é conceituado como uma intolerância à glicose diagnosticada pela primeira vez durante a gestação e que pode ou não persistir após o parto (OMS, 1999). Além desta, outras formas de DM diagnosticadas antes da gravidez podem trazer riscos à gestação e ao conceito, como o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) (ocorrência de 0,1% das gestações) e diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) (ocorrência de 2 a 3% das gestações) (SBD, 2014).

Tanto em gestações com DM pré-gestacional, quanto no DMG, a incidência de malformações fetais é cerca de 3 a 5 vezes maior do que em gestações normais (REECE *et al.*, 1998). Em estudo com roedores, Freinkel (1988) observou um quadro semelhante ao dos humanos, com importantes alterações morfológicas no coração e tubo neural. Estas alterações mostraram ter relação com o período de exposição à hiperglicemia, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente elucidados (REECE *et al.*, 1998; GUTIERREZ *et al.*, 2007). As principais evidências apontam para o envolvimento de causas multifatoriais, como o excesso de radicais livres, modificações no perfil lipídico das membranas celulares, massiva produção de sorbitol e aumento da produção de fibronectina. Todos estes fatores agem de forma sincrônica e podem resultar em déficit funcional na vida adulta (GUTIERREZ *et al.*, 2007).

Os modelos animais de diabetes materna induzida por estreptozotocina (STZ) têm sido largamente utilizados no estudo do desenvolvimento fetal em condições de hiperglicemia. Atenção especial também tem sido voltada para a vida adulta da prole de animais diabéticos (GUTIERREZ *et al.*, 2007). A pesquisa com esses modelos permite um melhor controle das variáveis ambientais e uma identificação mais confiável das alterações verdadeiramente oriundas das condições pré-natais (DAMASCENO *et al.*, 2002).

Em estudo publicado em 2010, demonstramos disfunção endotelial em ratos adultos expostos ao diabetes materno (PORTO *et al.*, 2010). Entretanto, ainda são escassas as informações sobre os comprometimentos da função cardíaca (GUTIERREZ *et al.*, 2007), evidenciando a necessidade de esforços neste sentido, visto que as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 80% da mortalidade de pacientes diabéticos (ARONSON e RAYFIELD, 2002), além de ser a principal causa de morte perinatal em filhos de mães diabéticas (GARCIA-PATTERSON *et al.*, 2004).

Neste estudo, propõe-se analisar o impacto do diabetes materno sobre parâmetros cardíacos da prole adulta, mapeando os mecanismos envolvidos em possíveis alterações estruturais e/ou funcionais que possam acarretar comprometimento. Dessa forma, o presente estudo se justifica não só por abordar duas doenças crônicas de alta prevalência (diabetes e cardiopatias), mas por relacioná-las, visando fomentar informações essenciais para o correto tratamento.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Programação fetal

Na vida fetal, os tecidos e órgãos passam por períodos críticos de desenvolvimento, os quais coincidem com as fases de rápida divisão celular (WIDDOWSON e MCCANCE, 1975). A exposição a estímulos ou insultos durante este período crítico pode resultar em efeitos deletérios irreversíveis e no surgimento de doenças crônicas na vida adulta, o que tem sido chamado de “Programação fetal” (LUCAS, 1991). Entre os fatores apontados como potencialmente causadores de alterações fetais estão a nutrição fetal alterada e a exposição intrauterina a altas concentrações plasmáticas de glicocorticoides e glicose, por exemplo (DE BOO e HARDING, 2006).

A ideia de programação fetal serviu como base para a hipótese da “origem fetal das doenças dos adultos”, também conhecida como “hipótese de Barker”, que surgiu no final da década de 80 a partir de três estudos conduzidos por David Barker (BARKER e OSMOND, 1986; BARKER *et al.*, 1989; BARKER *et al.*, 1993). Tal hipótese propõe que influências adversas durante a vida intrauterina podem resultar em alterações metabólicas e fisiológicas, as quais aumentam o risco de doenças na idade adulta (BARKER *et al.*, 1989). Especificamente, Barker e seus colaboradores chegaram a esta conclusão ao observar que as regiões da Inglaterra que tiveram as maiores taxas de mortalidade infantil no início do século XX, especialmente em virtude de baixo peso ao nascer, também tiveram as maiores taxas de mortalidade por doenças coronarianas décadas posteriores (BARKER e OSMOND, 1986).

Após o surgimento dessa hipótese, diversos estudos epidemiológicos e experimentais evidenciaram que a nutrição materna perinatal e o baixo peso ao nascer podem resultar em consequências duradouras, capazes de sensibilizar o conceito para o desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta, tal como obesidade (KENSARA; WOOTTON; PHILLIPS, 2005), síndrome metabólica (BARKER *et al.*, 1993; JAQUET; DEGHMOUN; CHEVENNE, 2005), DM2 (HALES e BARKER, 1992; JAQUET; GABORIAU; CZERNICHOW, 2000), doenças cardiovasculares e hipertensão (ERIKSSON; FORSEN; TUOMILEHTO, 2000; BARKER, 2004). Além destas, existem evidências epidemiológicas

para o surgimento de outros agravos a partir da programação fetal, tal como neoplasias, osteoporose, depressão e esquizofrenia (DE BOO e HARDING, 2006).

De acordo com Barker *et al.* (2002), o baixo peso ao nascer associado a um rápido crescimento pós-natal é o fenótipo associado ao maior risco de doenças na fase adulta. Tal fenótipo foi designado de “*catch-up growth*” por Cianfaranri *et al.* (1999) e sua base teórica está centrada no conceito de “plasticidade do desenvolvimento” (BARKER, 2007), ou seja, a capacidade de um genótipo específico poder originar diferentes estados morfofisiológicos como resultado de eventos epigenéticos (ODOM e TAYLOR, 2010).

A epigenética envolve o estudo dos mecanismos que regula a adaptação fetal ao meio ambiente. Este conceito foi definido pela primeira vez no início dos anos 1940 pelo biólogo desenvolvimentista Conrad Waddington para explicar as interações dos genes com o seu ambiente e o surgimento dos diferentes fenótipos (WADDINGTON, 1940). A partir desta definição inicial, a epigenética foi direcionada ao estudo de fenótipos resultantes de alterações cromossômicas sem que a sequência do DNA tenha sido afetada (BERGER *et al.*, 2009). Dentro dessas alterações, estão incluídas modificações pós-translacionais de caudas de histonas (acetilação, metilação, fosforilação, etc.), metilação do DNA e excessivo enovelamento do DNA nos nucleossomas (MURRELL; RAKYAN; BECK, 2005). Estes processos desempenham papéis críticos no desenvolvimento das características e das doenças humanas. Uma vez que o epigenoma é programado especialmente durante o desenvolvimento embrionário, a exposição nutricional e ambiental *in utero* durante esse período pode induzir eventos epigenéticos significativos (ODOM e TAYLOR, 2010).

Como resultado desses achados, surgiram duas teorias para explicar a relação causal entre baixo peso ao nascer e doenças da idade adulta. A primeira foi a hipótese conhecida como “*The Thrifty Genotype*”, proposta por Neel (1962), a qual sugere que foram selecionados alelos para a resistência à insulina e redução da captação de glucose em tempo de fome, o que seria vantajoso em termos de sobrevivência, mas problemático durante a abundância nutricional. A segunda hipótese, “*Thrifty Phenotype Hypothesis*”, foi proposta por Hales e Barker (2001) e defende que o DM2 é resultado de um ambiente intrauterino desfavorável e que os fatores genéticos desempenham muito pouco ou nenhum papel neste processo. Esta hipótese admite que, para assegurar o correto desenvolvimento de órgãos vitais como o cérebro, um feto sujeito a má nutrição, limita o desenvolvimento de tecidos

como o músculo, o pâncreas e o rim, adaptando o seu metabolismo. Apesar das duas hipóteses não serem mutuamente exclusivas, existe forte evidência de que a “*Thrifty Phenotype Hypothesis*” seja mais adequada para explicar esta relação causal, visto que estudos em gêmeos monozigóticos demonstraram que a genética, por si só, não é suficiente para explicar todos os achados e que os fatores ambientais representam um papel importante (BO *et al.*, 2000; POULSEN e VAAG, 2006). Outras evidências surgiram com o estudo dos indivíduos expostos *in utero* ao período de fome da 2ª Guerra Mundial, nestes indivíduos foi observado baixo peso ao nascer e intolerância à glucose aos 50 anos de idade (RAVELLI *et al.*, 1998).

Mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado que, não só o baixo peso, mas também a exposição fetal à hiperglicemia materna pode contribuir para o surgimento de obesidade e doenças na vida adulta (DABELEA *et al.*, 2000; WEISS *et al.*, 2000). De acordo com Dörner, Plagemann e Reinagel (1987), a exposição a alta concentração de glicose estimula uma excessiva secreção de insulina pelo pâncreas fetal. Por sua vez, a hiperinsulinemia presente durante um período crítico da organogênese cerebral conduz a uma má formação dos centros regulatórios hipotalâmicos que controlam o metabolismo e até mesmo dos sistemas regulatórios energéticos. Tais dados foram complementados com estudos epidemiológicos que mostraram a importância do DMG no desenvolvimento da obesidade, intolerância à glicose, DM2, síndrome metabólica, entre outras alterações (HARDER *et al.*, 2001; MONASTA *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2011).

A extensa investigação que tem sido desenvolvida pretende encontrar os mecanismos responsáveis pela relação causal evidenciada nos estudos epidemiológicos, pois a grande importância desta temática é a possibilidade de prevenção primária dos agravos observados não só na fase neonatal, mas também na fase adulta.

2.2 Hiperglicemia na gravidez

A alta prevalência mundial de diabetes e sua frequência cada vez maior em mulheres em idade gestacional têm gerado novos dados de pesquisa sobre a relação entre a hiperglicemia e a gravidez (WHO, 2013). A gravidez é, naturalmente, um período progressivamente hiperglicêmico e esse quadro é extremamente necessária para as necessidades nutricionais do feto em crescimento, visto que a glicose parece ser o principal

substrato para o feto humano durante a gravidez (VRACHNIS *et al.*, 2012a). Em geral, a elevação fisiológica da glicemia ocorre na segunda metade da gravidez e é resultado da diminuição da sensibilidade à insulina causada pela ação de hormônios placentários (estrogênio, progesterona e somatomamotropina coriônica humana) e não placentários (glicocorticoides e glucagon) (BERTINI, 2001; KITZMILLER e DAVIDSON, 2001). Contudo, a intolerância à glicose e o aumento excessivo da glicemia durante a gestação, caracterizado como DMG, tem se tornado um achado cada vez mais comum, sendo considerado o principal transtorno metabólico durante a gestação (SACKS *et al.*, 2012). Tal estado hiperglicêmico expõe as mulheres afetadas a um maior risco de síndrome metabólica, doença cardiovascular e desenvolvimento de DM2 no período após o parto (VRACHNIS, *et al.*, 2012b).

Com prevalência entre 3% e 25% das gestações, dependendo do grupo étnico, da população e do critério diagnóstico utilizado (SACKS *et al.*, 2012; SCHMIDT *et al.*, 2001), o DMG está entre as condições mais preocupantes da gravidez. Sua etiologia inclui fatores de risco pessoais e familiares, os quais estão descritos no Quadro 1. Seu rastreamento deve ser feito entre a 24^a e 28^a semana de gestação em todas as gestantes sem diagnóstico prévio de diabetes, através da avaliação da glicemia de jejum e do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). Este teste consiste na ingestão de uma solução contendo 75 g de glicose e medições da glicemia antes e depois da ingestão (após 1h e 2h). O teste deve ser efetuado de manhã, após um jejum de 8 a 14 horas e deve ser precedido, nos 3 dias anteriores, de atividade física regular e de dieta não restritiva (HAPO, 2008). Os resultados dessa avaliação são interpretados de diferentes formas, dependendo do critério adotado. Atualmente, o critério mais aceito é o proposto a partir dos resultados do estudo *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes* (HAPO), o qual também foi adotado pelo *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG), pela Sociedade Brasileira de Diabetes e apoiada recentemente pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013). Tal critério diagnóstico para o DMG assume novos pontos de corte para o jejum, para 1 e para 2 horas do TOTG, que são ≥ 92 mg/dL, ≥ 180 mg/dL e ≥ 153 mg/dL, respectivamente.

Quadro 1 - Fatores de risco para diabetes gestacional

Idade igual ou maior que 35 anos

Sobrepeso, obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual

Deposição central excessiva de gordura corporal

História familiar de diabetes em parentes de primeiro grau

Crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual

Antecedentes obstétricos de abortamentos de repetição, malformações, morte fetal ou neonatal, macrossomia ou DMG

Síndrome de ovários policísticos

Baixa estatura (menos de 1,5 m)

Fonte: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014)

De acordo com Vambergue e Fajardy (2011), o comprometimento feto-placentário e a programação intrauterina de doenças na vida adulta da prole induzidos pelo DMG são semelhantes aos induzidos por diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2. O nível de comprometimento geral está, em parte, relacionado ao nível de glicemia materna e o momento de exposição durante o desenvolvimento do embrião (REECE *et al.*, 1996; REECE *et al.*, 1998; SOBNGWI *et al.*, 2003). Contudo, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente elucidados, o que tem estimulado o empenho no estudo desse tema.

Os índios *Pima* dos Estados Unidos estão entre os primeiros grupos onde as consequências do diabetes materno foram estudadas (KNOWLER *et al.*, 1978). Nessa população, a drástica mudança de hábitos nutricionais dos últimos anos, com a adoção da “dieta ocidental”, tem resultado em alta prevalência de obesidade, de DM2 e de DMG. Através de estudo epidemiológico, Franks *et al.* (2006) observaram um aumento de cerca de seis vezes na incidência de DM2 em filhos de mães diabéticas ou pré-diabéticas. Além disso, outros autores observaram altos níveis de pressão sistólica (BUNT; TATARANNI; SALBE, 2005) e aumento no risco de obesidade na infância (PETTITT *et al.*, 1983)

Além de estudos epidemiológicos, nos últimos anos também têm sido extensivamente utilizados modelos animais para o estudo das consequências do DMG sobre a prole jovem ou adulta. Os roedores constituem o grupo de animais mais utilizado e a estreptozotocina (STZ) é considerada a droga clássica para a indução do diabetes *mellitus* (LIKE e ROSSINI, 1976; GOLDMAN *et al.*, 1985). A STZ é uma glicosamina-nitrosureia e um membro do

grupo de alquilantes antineoplásicos com ação citotóxica sobre as células β -pancreáticas (BOLZAN e BIANCHI, 2002). Ela apresenta baixa lipofilicidade e baixa capacidade de transpor a membrana plasmática, podendo apenas alcançar o interior das células pancreáticas através dos transportadores de glicose GLUT-2 (LENZEN, 2008).

Alguns mecanismos são propostos para a citotoxicidade produzida pela STZ. A alcalinização do DNA celular e subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase causam depleção rápida e letal de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) nas células pancreáticas, com subsequente redução no nível de ATP, inibição da síntese de insulina e necrose celular por depleção da energia celular (BENNETT e PEGG, 1981). Além disso, outras evidências indicam que radicais livres podem ter um papel essencial no efeito diabetogênico da STZ (TAKASU *et al.*, 1991). Em doses convencionais, o quadro apresentado será semelhante ao do DM1 (GOLDMAN *et al.*, 1985). Além disso, outros modelos foram desenvolvidos para mimetizar o estado do DM2 e o DMG. Em animais de laboratório, estes tipos de diabetes são classificados como diabetes moderado (glicemia entre 120 e 300 mg/dL). Dentre esses modelos, destaca-se a administração de diferentes doses de STZ durante o período gestacional (MERZOUK *et al.*, 2001) e a introdução de dieta hiperlipídica associada a baixas doses de STZ (LUO *et al.*, 1998). No entanto, os resultados obtidos são divergentes no que se refere à glicemia e as consequências sobre a prole.

2.3 Consequências da hiperglicemia materna sobre a placenta e a prole

Os efeitos do diabetes materno sobre a prole podem surgir a curto ou a longo prazo, estando evidentes já no útero ou apenas na idade adulta ou idosa. Além disso, a gravidez com diabetes apresenta alto risco para várias distorcias, incluindo alterações placentárias (LEUSHNER, 1986) e parto prematuro (WEINDLING, 2009).

Esse comprometimento feto-placentário e a programação intrauterina de doenças na vida adulta da prole induzidas pelo DMG são semelhantes às que foram induzidas por DM1 ou DM2. Apesar da existência de algumas diferenças morfológicas e de desenvolvimento entre a placenta de roedores e de mulheres, existe similaridade com as alterações induzidas pelo diabetes materno na placenta de modelos diabéticos experimentais e de pacientes diabéticos (VAMBERGUE E FAJARDY, 2011).

2.3.1 Alterações placentárias

A placenta está localizada na interface entre a circulação materna e fetal com funções fundamentais para a gravidez. O seu desenvolvimento e sua função podem ser afetados profundamente pela exposição à hiperglicemia (DESOYE e HAUGUEL-DE MOUZON, 2007). A hiperglicemia materna e fetal altera a produção de várias proteínas da placenta e pode afetar o seu metabolismo e crescimento. Além disso, pode ocorrer aumento da distância de difusão entre as circulações sistêmicas materno e fetal devido a um espessamento da membrana basal trofoblástica com quantidades mais elevadas de colágeno, especialmente do tipo IV (LEUSHNER, 1986).

A placenta é formada durante o primeiro trimestre de gestação e a exposição à hiperglicemia nesta época pode induzir a uma redução da proliferação de trofoblasto e retardo no crescimento e desenvolvimento da placenta (WEISS *et al.*, 2001). Esse mecanismo poderia explicar a maior incidência de aborto espontâneo, de pré-eclâmpsia e, em alguns casos, pode ser a causa de restrição de crescimento intrauterino (HIDEN *et al.*, 2008).

No DM1 e no DMG, o estroma das vilosidades é edemaciado e apresenta aumento de células de Hofbauer. O aumento do número dessas células contribui para uma maior liberação de citocinas placentárias como a leptina, fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas, com consequente modificação das funções metabólicas e endócrinas placentárias (VARASTEHPOUR *et al.*, 2006). A proliferação de capilares sanguíneos e o aumento da área de superfície capilar também tem sido descrito, o que resulta em uma hiper-vascularização e um aumento da superfície de permuta que pode contribuir para a difusão de gases através de uma placenta já prejudicada (SHERER e DIVON, 1996). Por outro lado, tais alterações resultam em importantes alterações morfológicas da placenta, incluindo o aumento de seu peso (TARICCO, 2003).

Alterações placentárias ainda mais comprometedoras para o desenvolvimento fetal já foram identificadas. Entre as principais, podem ser citadas as alterações no fornecimento de macronutrientes (TARICCO *et al.*, 2009) e a redução no fornecimento de oxigênio originário da circulação materna (MADSEN e DITZEL, 1984). Além da oferta prejudicada de

oxigênio, a demanda de oxigênio fetal é aumentada por conta do alto metabolismo aeróbio estimulado pela hiperinsulinemia fetal (VAMBERGUE e FAJARDY, 2011).

2.3.2 Efeitos imediatos do diabetes materno sobre a prole

Numerosos investigadores têm mostrado que um estado hiperglicêmico materno durante o período de organogênese pode produzir efeitos teratogênicos sobre o conceito (ERIKSSON *et al.*, 1991; REECE *et al.*, 1996; REECE *et al.*, 1998). De acordo com Freinkel *et al.* (1988), este período ocorre a partir do 9º até o 11º dia de gestação em ratos, e do 8º ao 10º dia em camundongos, aproximadamente.

Os mecanismos exatos pelos quais a hiperglicemia materna compromete a formação dos órgãos ainda não estão completamente elucidados. No entanto, foram propostas uma série de possibilidades. De acordo com Reece *et al.* (1998), a hiperglicemia e a hipercetonemia são fatores que comprometem o desenvolvimento do embrião, visto que podem afetar diretamente o saco vitelino. Em embriões de ratos submetidos a um ambiente com altos níveis de D-glucose, os vasos sanguíneos vitelínicos se tornaram escassos, desiguais e não uniformemente localizados. Nos mesmos embriões, as células da endoderme do saco vitelino têm um número reduzido de retículos endoplasmáticos rugosos, de ribossomos e de mitocôndrias (REECE *et al.*, 1998). Também foi observado aumento do estresse oxidativo no embrião em formação (HAGAY *et al.*, 1995) e alteração do perfil lipídico da membrana plasmática, com diminuição da densidade de ácido aracdônico e de mio-inositol (REECE *et al.*, 1996).

Alterações na constituição da matriz extracelular (MEC) também têm sido identificadas nos embriões expostos à hiperglicemia. Os componentes da MEC modulam e controlam a ligação entre as células e entre a própria matriz e as células, assim, são críticos na morfogênese (CAGLIERO *et al.*, 1993; SMOAK, 2004). Entre os principais componentes da MEC estão proteínas como a fibronectina, o colágeno, os proteoglicanos e as glicoproteínas, as quais podem formar depósitos em diferentes tipos de tecidos no decurso do DM (CHEN *et al.*, 2000). Como resposta à hiperglicemia, a fibronectina e o colágeno podem se acumular nos rins, coração, vasos sanguíneos e pele (MAUER; STEFFES; BROWN, 1981). Nesse processo, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), indutor endógeno para o aumento da MEC, parece apresentar importante função, visto que

em embriões de camundongos examinados por imuno-histoquímica foi observado um aumento da expressão do TGF- β no tecido cardíaco após serem expostos a um meio hiperglicêmico (600 mg/dL) durante 24 horas. No coração desses mesmos embriões observou-se um aumento dos níveis de fibronectina (SMOAK, 2004). Portanto, fica claro que a embriopatia diabética apresenta etiologia multifatorial e depende de vários eventos aberrantes e sincrônicos.

Além de alterações da MEC, malformações de órgão e tecidos, tal como defeitos na formação do tubo neural, do pâncreas e do coração, são comumente encontradas, e essas mudanças parecem apresentar relação direta com o nível de glicemia apresentado pela mãe (GUTIERREZ *et al.*, 2007). Segundo Reece *et al.* (1998), a probabilidade de malformações congênitas em ratos expostos a um ambiente intrauterino hiperglicêmico é de 20% para níveis de glicose acima de 300 mg/dL, 50% para glicemia materna maior que 600 mg/dL, e quase 100% para glicemia materna maior que 950 mg/dL. Os defeitos cardíacos, em particular, são relatados como sendo cinco vezes mais comuns entre filhos de mães diabéticas, o que representa um segmento significativo de anomalias que podem ser reduzidas com controle glicêmico durante a gestação (BECERRA *et al.*, 1990; MEYER-WITTKOPF; SIMPSON; SHARLAND, 1996). A identificação e tratamento de hiperglicemia em mulheres que entram nos seus anos reprodutivos também foi sugerido como método para prevenir as principais anomalias cardíacas e não cardíacas (LOFFREDO; WILSON; FERENCZ, 2001).

Evidências epidemiológicas claramente mostram que o diabetes materno afeta negativamente o desenvolvimento do coração da prole. Em estudo epidemiológico desenvolvido por Meyer-Wittkopf *et al.* (1996) observou-se a ocorrência de malformações cardíacas em 3,1% dos filhos de um grupo de 326 mulheres diabéticas. Em outro estudo, considerado uma das maiores séries de estudos com mães diabéticas, Veille *et al.* (1992) observaram hipertrofia do septo ventricular em 75% dos fetos estudados, também observaram uma correlação significativa entre os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) da mãe e a largura do septo ventricular. Além de hipertrofia, outros estudos identificaram atresia mitral, dupla saída do ventrículo direito, atresia da valva aórtica, estenose pulmonar e aórtica, tetralogia de Fallot e defeitos na formação dos septos (MEYER-WITTKOPF *et al.*, 1996, LOFFREDO *et al.*, 2001; ABU-SULAIMAN e SUBAIH, 2004). Possível

migração aberrante de células da crista neural pode ser responsável por tais malformações congênitas relacionadas com a hiperglicemia materna (MEYER-WITTKOPF *et al.*, 1996).

De modo semelhante, alterações morfológicas também foram observadas no pâncreas da prole de mães diabéticas (SERRADAS *et al.*, 2002; DAS FETITA *et al.*, 2006). Durante a gestação em humanos, as primeiras ilhotas pancreáticas surgem por volta da décima segunda semana, se tornam vascularizadas por volta da décima sexta semana e respondem prontamente à mudanças nos níveis de glicose e aminoácidos apenas ao final da gestação (FOWDEN E HILL, 2002). Assim, eventos adversos que ocorram durante a segunda metade da gravidez podem afetar tanto a proliferação/diferenciação de células beta pancreáticas quanto a sua funcionalidade (FOWDEN E HILL, 2002).

Essas alterações fetais resultam em alta frequência de eventos adversos durante e após o parto, os quais, como dito anteriormente, aumentam gradualmente com o nível de hiperglicemia materna (MEYER-WITTKOPF *et al.*, 1996). Os dados do estudo HAPO (2008) sugerem alto risco para macrosomia, hipoglicemia e hiperinsulinemia nos neonatos de mães diabéticas. Adicionalmente, tais neonatos apresentam maior hematócrito (WIDNESS *et al.*, 1981) e são mais susceptíveis a hiperbilirrubinemia (LEIPOLD *et al.*, 2004), hipocalcemia e hipomagnesemia (MIMOUNI *et al.*, 1990; DEMARINI, 1994). Também apresentam maior taxa de mortalidade, maior risco de insuficiência respiratória, de isquemia hipóxica, de prematuridade e de serem separados de suas mães após o nascimento (CEMACH, 2007).

A mortalidade perinatal relacionada com a gravidez diabética tem sido reduzida nas últimas décadas devido à melhoria na triagem e assistência à gestante diabética (HAPO, 2008). No entanto, o principal fator para a morte perinatal continua sendo malformações congênitas e doenças do coração (GUTIERREZ *et al.*, 2007). Neste sentido, a prevenção de tais eventos pode ser alcançada com o controle glicêmico durante o processo de organogênese. Corroborando com esses dados, resultados semelhantes também podem ser obtidos quando se faz uso de antioxidantes e suplementação de ácidos graxos poli-insaturados e mio-inositol, para a redução de radicais livres e recuperação da composição das membranas plasmáticas, respectivamente (REECE *et al.*, 1996).

2.3.3 Efeitos tardios do diabetes materno sobre a prole

Em detrimento aos fatores ambientais, os fatores genéticos foram considerados como uma possível explicação para a associação entre a exposição intrauterina à hiperglicemia e o surgimento de doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta. De acordo com esta hipótese, as mães com diabetes pré-gestacional ou com DMG podem apresentar genótipo específico que transmite alta susceptibilidade para tais transtornos a seus descendentes. Contudo, os dados disponíveis atualmente sugerem fortemente um papel preponderante para o ambiente intrauterino (SIMEONI e BARKER, 2009).

Há evidências crescentes de que a exposição pré-natal ao DM materno aumenta os riscos de alterações a longo prazo na prole, tal como, obesidade, transtornos metabólicos, cardiovasculares e renais (MANDERSON *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2005; FETITA *et al.*, 2006; METZGER, 2007; VOHR e BONEY, 2008). Além disso, dados recentes, em particular aqueles do estudo HAPO (2008), demonstram que a elevada glicemia materna, mesmo que na ausência de DM, podem “programar” o surgimento de doenças no futuro. Entretanto, a importância dos fatores genéticos deve ser levada em consideração, visto que, as alterações induzidas por um ambiente intrauterino impróprio podem ser transmitidas para as próximas gerações (PINHEIRO, 2008). Dessa forma, a predisposição genética para o diabetes pode atuar como um predisponente ou agravante para determinar o risco de diabetes mais tarde na descendência.

Um exemplo de uma função combinada de fatores genéticos e ambientais intrauterinos foi encontrado em um grupo de pacientes diabéticos conhecido pela sigla MODY-3 (maturity-onset diabetes of the young 3), cuja doença é provocada por um distúrbio que afeta o gene do fator nuclear 1 α de hepatócito (HNF1A). Em indivíduos portadores de tal alteração e cuja mãe apresentou hiperglicemia durante a gravidez, o diabetes é diagnosticado mais cedo do que nos portadores cuja mãe não era diabética (STRIDE *et al.*, 2005).

O entendimento atual é que a programação para o desenvolvimento de disfunção ou doença é resultante de uma combinação de mecanismos que atuam sobre órgãos, tecidos, células e em nível molecular. Órgãos ou sistemas, como o rim ou sistema cardiovascular estão em risco, uma vez que alcançam o desenvolvimento quantitativo total apenas no final

da gestação e no período perinatal. Assim, fatores ambientais podem alterar este processo, reduzindo quantitativamente a formação de componentes, por exemplo, reduzindo o número de néfrons no rim ou o número de vasos sanguíneos em determinado tecido (SIMEONI e BARKER, 2009). Tais alterações, que podem ser o preço pago para a sobrevivência, apenas tendem a comprometer a função do órgão ou sistema mais tarde na vida, quando há o aumento das exigências fisiológicas (TAUZIN *et al.*, 2006).

Mudanças ao nível molecular, capazes de afetar de forma duradoura a expressão gênica, podem ser a base etiológica para uma ampla gama de doenças do adulto. Além disso, mecanismos epigenéticos da expressão do gene alterado podem muito bem estar envolvidos, pois permitem duráveis mudanças ao longo da vida na transcrição gênica por meio de metilação do DNA em ilhotas CpG ou metilação de histonas ou acetilação, na ausência de qualquer alteração na sequência de DNA do gene (SIMEONI e BARKER, 2009).

- Obesidade e alterações metabólicas

Apenas nas últimas décadas, a obesidade foi incluída como uma provável consequência para a prole de gestações complicadas pelo diabetes. Apesar desta hipótese ser amplamente aceita atualmente, existem relativamente poucos estudos que examinaram tal questão, visto que a maior parte concentrar-se quase que exclusivamente no metabolismo da glicose. Ainda mais escassos são os estudos com modelos animais, os quais permitem um maior controle de variáveis como a dieta e atividade física.

Até o momento, apenas dois grandes estudos epidemiológicos examinaram de forma aprofundada o efeito da exposição ao diabetes intrauterino sobre o crescimento, sobre o risco de obesidade e de diabetes tipo 2 na prole: um estudo com índios Pima (PETTITT *et al.*, 1993) e um estudo sobre diabetes na gravidez desenvolvido na Northwestern University em Chicago (SILVERMAN *et al.*, 1991). No primeiro estudo, os filhos de mulheres pré-diabéticas ou com DMG nativas da tribo de índios Pima norte-americanos apresentaram aumento de peso corporal ao nascimento e em todas as outras idades avaliadas. No outro estudo, os pesquisadores relataram crescimento excessivo em uma população multiétnica de filhos de mulheres com diabetes durante a gravidez, incluindo tanto o DMG quanto o diabetes pré-existente. As crianças foram examinadas no momento do nascimento, com a idade de 6 meses e anualmente até 8 anos de idade. O índice de simetria (um índice de obesidade com um valor normal de 1,0) era normal com 1 ano de idade, mas aumentou

durante o acompanhamento, de modo que aos 8 anos, o índice era de quase 1.3, ou seja, tais crianças eram, em média, 30% mais pesadas do que o esperado para a sua altura. Entretanto, outros estudos, como os de Whitaker *et al.* (1998) e Gillman *et al.* (2003) não chegaram a observar obesidade em filhos de mães diabéticas, tornando o tema controverso.

Os mecanismos pelos quais a exposição ao diabetes *in utero* pode aumentar o risco de obesidade após o nascimento não são completamente compreendidos, mas algumas hipóteses têm sido levantadas. Durante o período pré-natal, o feto exposto ao diabetes materno apresenta concentrações elevadas de insulina (FREINKEL, 1980) e, mais recentemente, o aumento nos níveis fetais de leptina também tem sido relatado (MANDERSON *et al.*, 2003). Há sugestões de que a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia possam ser fatores chaves para o surgimento de obesidade no futuro, visto que, nos estudos com índios Pima e da Northwestern University mostraram forte correlação entre a concentração de insulina plasmática da criança e o seu peso corporal posteriormente. Da mesma forma, a concentração de leptina medida no nascimento foi positivamente relacionada aos valores de peso corporal (MANDERSON *et al.*, 2003)

A partir de tais dados, uma interessante hipótese foi formulada por Plagemann (2004), a qual é conhecida como “teratogênese funcional”. Nesta hipótese, a exposição a níveis elevados de hormônios como a insulina e leptina durante o período de ontogênese pode levar a uma má programação de neurônios neuropeptidérgicos do hipotálamo, ocasionando um aumento do neuropeptídeo Y orexígeno, o que contribui para um quadro de hiperfagia e posterior desenvolvimento de sobrepeso.

Por outro lado, se o impacto da hiperglicemia materna sobre o peso corporal da prole permanece confuso, o impacto sobre o metabolismo da glicose parece estar cada vez mais claro, visto que estudos epidemiológicos e experimentais têm relatado uma relação claramente positiva para a exposição intrauterina à hiperglicemia e o surgimento de resistência à insulina e DM2 após o nascimento (PINHEIRO *et al.*, 2008). Entretanto, ainda são incertas as idades para o surgimento de tais alterações. Também ainda não está claro o mecanismo pelo qual ocorre tais alterações metabólicas. Entretanto, como abordado anteriormente, as evidências cada vez mais pousam sobre o envolvimento de modificações epigenéticas que podem afetar a expressão gênica e que são programadas durante a janela crítica do desenvolvimento perinatal, podendo inclusive ser transmitidas para as próximas

gerações (PINHEIRO *et al.*, 2008). Outras potenciais causas para as alterações metabólicas, como a massa reduzida de células β pancreáticas, defeito na angiogênese do pâncreas e a hiperinsulinemia fetal, podem refletir a forma como o feto exposto a diabetes materno é "programado" para exibir intolerância à glicose mais tarde na vida (FETITA *et al.*, 2006). Dessa forma, mulheres expostas ao diabetes materno apresentarão maior chance de desenvolver um quadro de hiperglicemia durante a gravidez, formando um círculo vicioso com importantes implicações para a saúde pública no contexto atual da epidemia crescente de diabetes (Figura 1).

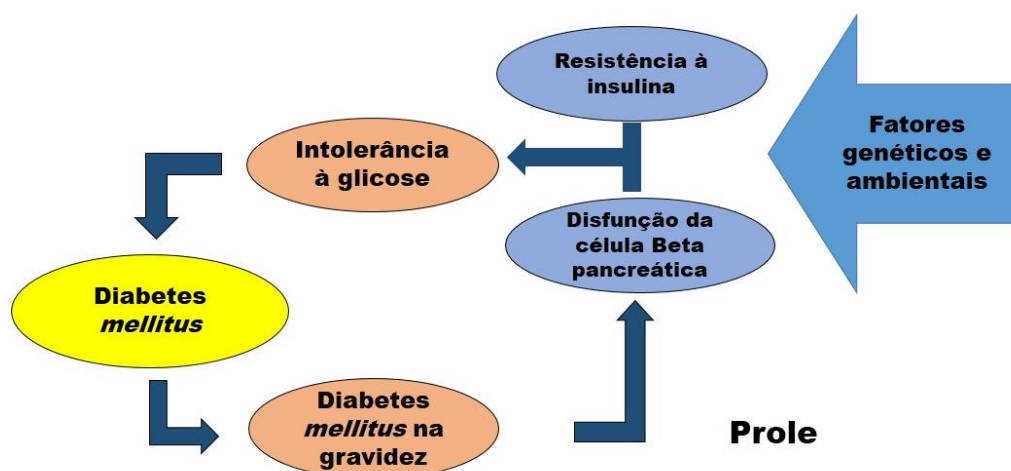


Figura 1 - Papel potencial da exposição fetal ao diabetes materno na epidemia de diabetes *Mellitus* tipo 2 em todo o mundo: um círculo vicioso. A combinação de resistência à insulina com disfunção das células beta leva a um estado de intolerância à glicose e, conseqüentemente, ao diabetes tipo 2. Filhos expostos ao diabetes materno podem desenvolver disfunção das células beta pancreáticas e apresentarão maior risco de desenvolver diabetes tipo 2, podendo resultar em um verdadeiro círculo vicioso (FETITA *et al.*, 2006).

- Alterações cardiovasculares

Estudos experimentais e clínicos têm apresentado alterações na função cardiovascular nos filhos de mães diabéticas. Estas alterações podem surgir a curto ou a longo prazo e incluem tanto alterações funcionais quanto alterações morfológicas em vasos sanguíneos e no coração. Tal comprometimento pode resultar em importantes alterações de parâmetros orgânicos, tal como o aumento da pressão arterial (ROCHA *et al.*, 2005).

A disfunção endotelial é um achado comumente observado na prole exposta à hiperglicemia materna e parece ser crítico no desenvolvimento de doença vascular (TADDEI *et al.*, 1992). Ela pode ser caracterizada como uma perda das funções de regulação resultantes de alterações no tônus vascular, de inflamação e/ou de estresse oxidativo, mas também por prejuízo na angiogênese e na capacidade de reparação endotelial (INGRAM *et al.*, 2008; BLUE *et al.*, 2014). Entre os trabalhos pioneiros na avaliação da função vascular dessa prole está o trabalho de Holemans *et al.* (1999), no qual foi observado prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratos adultos provenientes de fêmeas diabéticas. Da mesma forma, Rocha *et al.* (2005) também demonstraram prejuízo da função endotelial em artérias mesentéricas desse mesmo modelo experimental. Contudo, em nenhum destes estudos os mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial foram estudados.

Publicações prévias do nosso laboratório caracterizaram as principais alterações funcionais em artérias mesentéricas de ratos Wistar adultos expostos à hiperglicemia materna (RAMOS-ALVES *et al.*, 2012a; RAMOS-ALVES *et al.*, 2012b). Nesses trabalhos, foi observado um aumento na produção de prostanoídes vasoconstrictores derivados da COX-2, especialmente o TxA₂, a PGE₂ e a PGF_{2α}, o que reduziu o relaxamento dependente do endotélio e aumentou a responsividade noradrenérgica no leito mesentérico. Em outro estudo, também demonstramos que as aortas desses animais apresentaram redução no relaxamento induzido por acetilcolina e que isso apresentou relação direta com uma menor atividade de canais para potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) (PORTO *et al.*, 2010).

De acordo com outros estudos (PINTER *et al.*, 2001; LARGER *et al.*, 2004), um ambiente intrauterino desfavorável, como no diabetes gestacional, também pode comprometer a angiogênese do conceito a curto e a longo prazo, possivelmente através da diminuição da proliferação e do aumento da apoptose de células endoteliais, ou da redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Tais alterações são componentes essenciais para um posterior desenvolvimento de disfunção vascular e doença em idade adulta, visto o importante papel do endotélio no desenvolvimento da vasculatura e na motricidade vascular (SIMEONI e BARKER, 2009).

Alterações vasculares precoces também foram identificadas em estudos com humanos, como no estudo de Skilton (2008), onde foram identificados (através de

ultrassonografia) claros sinais de aterosclerose em estágio inicial em aortas de fetos e de neonatos expostos à hiperglicemia materna. Tais alterações vasculares podem levar ao surgimento de outras alterações cardiovasculares no futuro, tal como a hipertensão arterial, a qual tem sido uma condição frequentemente observada tanto em modelos experimentais quanto em estudos epidemiológicos com filhos de mães diabéticas. No estudo de Rocha *et al.* (2005), a pressão arterial média (PAM) de ratos Wistar oriundos de fêmeas diabéticas foi acompanhada até os 12 meses de idade através de medida indireta. Nesses animais, a PAM apresentou níveis significativamente maiores na maior parte do tempo analisado quando comparados aos animais controles. Entretanto, outros estudos experimentais não observaram aumento da pressão arterial neste modelo, tal como no trabalho de Holemans *et al.* (1999) e de Nehiri *et al.* (2008). De forma geral, os mecanismos envolvidos na alteração da pressão arterial são complexos e o conhecimento atual é largamente confinado aos mecanismos renais e vasculares (BOUBRED *et al.*, 2007).

O impacto do diabetes materno sobre a função cardíaca da prole ainda não está totalmente elucidado. Entre os principais trabalhos focados no estudo do coração dessa prole, a maioria está centrada no estudo de alterações a curto prazo, especialmente as adquiridas durante o período de organogênese (MITANCHEZ *et al.*, 2015). Outros dados experimentais com prole adulta de ratas diabéticas identificaram distúrbios na regulação simpática do nó sinoatrial (HOLEMANS *et al.*, 1999) e alterações na função sistólica e diastólica (AGOUDEMOS *et al.*, 2011). A piora desse quadro com o avançar da idade pode resultar em comprometimento circulatório e insuficiência cardíaca.

- Alterações na sensibilidade barorreflexa e no sistema nervoso autônomo

Os níveis de pressão arterial (PA) são mantidos dentro de valores relativamente estreitos através da atuação de mecanismos de controle a curto e a longo prazo. Momento a momento, o controle da função cardiovascular só é possível devido a existência de mecanismos reflexos que atuam através da divisão simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo (SNA). Tais reflexos são responsáveis pelo controle a curto prazo da PA e envolvem barorreceptores, vias nervosas aferentes, centros de integração, vias nervosas eferentes e órgãos efetores (GUYTON e HALL, 2006).

Os barorreceptores são as principais estruturas responsáveis pela detecção de perturbações na PA (MACHADO, 2001). Eles são formados por terminações nervosas

distribuídas na camada adventícia de grandes artérias como a aorta (arco aórtico) e carótida (seio carotídeo), e são estimulados pelo nível de distensão da parede dessas artérias (HAYBARA e SANTOS, 2000). Elevações ou reduções abruptas na PA resultam, respectivamente, em aumento ou diminuição na frequência de disparo de potenciais de ação nestes receptores, esses disparos são transmitidos para o núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo através do nervo glossofaríngeo (barorreceptores carotídeos) ou vago (barorreceptor aórtico) (TIMM *et al.*, 2003).

No NTS os sinais são integrados e a resposta apropriada é emitida através de vias eferentes simpáticas ou parassimpáticas que efetuam a mudança na variável controlada (GUYTON e HALL, 2006). Em situações de aumento da PA, por exemplo, a maior frequência de potenciais de ação chegando ao NTS irá desencadear uma sequência de eventos e ativação de vias simpatoinibitórias do barorreflexo. Tais vias envolvem projeções excitatórias do NTS para a região ventrolateral caudal bulbar (CVLM - Caudal Ventrolateral Medulla), e projeções inibitórias desta para a região ventrolateral rostral bulbar (RVLM - Rostral Ventrolateral Medulla), onde se encontram os neurônios pré-motores simpáticos (MACHADO *et al.*, 1997). A ativação desta via neuronal resulta, portanto, numa inibição do tônus simpático direcionado aos vasos sanguíneos e ao coração, a fim de promover queda na PA através da redução da resistência vascular periférica e da frequência cardíaca. Concomitantemente, projeções do NTS para o núcleo ambíguo (NA), ativam neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, resultando em maior descarga vagal em direção ao coração e, conseqüentemente, redução da frequência cardíaca (VERBERNE e GUYENET, 1992).

No caso contrário, ou seja, quando ocorre uma queda acentuada da PA, os barorreceptores aórticos e carotídeos são menos deformados e a atividade aferente em direção ao NTS é momentaneamente reduzida ou mesmo suprimida. Os neurônios do NTS, menos estimulados, deixam de excitar os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no núcleo dorsal motor do vago (DMV) e no NA, reduzindo, assim, o tônus vagal (AIRES *et al.*, 2011). Paralelamente, ocorrerá uma menor frequência de disparos direcionados aos neurônios depressores localizados na região CVLM e, conseqüentemente, os neurônios simpatomiméticos da região RVLM não serão inibidos, resultando em aumento da atividade simpática direcionada aos vasos sanguíneos e coração. Essa cadeia de eventos irá resultar no aumento da resistência vascular periférica e da frequência cardíaca, garantindo

as condições necessárias para a elevação da PA restabelecimento do seu valor basal (MACHADO *et al.*, 1997).

Enquanto a taquicardia observada durante a resposta barorreflexa é determinada por alterações em ambos os ramos autonômicos, incluindo a inibição da atividade parassimpático e a ativação simpática (principalmente), respostas bradicárdicas durante o barorreflexo são dependentes de descargas rápidas vagais dirigidas para o coração, visto que a atividade simpática é mais lenta para responder a mudanças bruscas de PAM (HEAD e MCCARTY, 1987).

Para a avaliação da sensibilidade barorreflexa, o método mais antigo e mais utilizado, principalmente na experimentação animal, foi descrito em 1969 por Smyth *et al.* (1969) e consiste na administração endovenosa em doses crescentes de um agente vasoconstrictor e de um agente vasodilatador a fim de evocar a resposta barorreflexa a partir da elevação e da redução da PA, respectivamente. O vasoconstrictor mais empregada é a fenilefrina, um potente agonista α_1 adrenérgico que induz aumento na PAM e bradicardia reflexa. O nitroprussiato de sódio (NPS) é o agente vasodilatador mais utilizado, trata-se de um doador de óxido nítrico (NO) e potente vasodilatador, causando queda na PA e ativando o reflexo de taquicardia (CAMPAGNOLE-SANTOS e HAIBARA, 2001).

A avaliação da sensibilidade é feita a partir do registro das alterações reflexas da FC (expressa em batimentos por minuto ou intervalo de pulso) e/ou da atividade simpática de nervos periféricos (como o nervo renal) (VASQUEZ *et al.*, 1995). Nesse sentido, a regressão linear está entre os métodos mais utilizados na literatura para se avaliar a responsividade, ou seja, o ganho do reflexo barorreceptor. Esse valor pode ser obtido pela relação entre as variações reflexas causadas na FC e entre as variações promovidas sobre a PAM ($\Delta FC/\Delta PAM$), o que permite a avaliação de respostas bradicárdicas e taquicárdicas separadamente (FARAH *et al.*, 1999).

Inúmeros fatores podem influenciar o ganho e a eficácia do barorreflexo, resultando em disfunção deste mecanismo e afetando a variabilidade cardiovascular (LANFRANCHI e SOMERS, 2002). De acordo com Vinik *et al.* (2003), a hiperglicemia está entre tais fatores, podendo induzir disfunção autonômica ainda no início da progressão do diabetes, o que se torna um fator de risco importante para morbidades cardíacas e para mortalidade em pacientes diabéticos. Outros autores também já identificaram relação positiva entre

hiperglicemia e alterações na função barorreflexa (LEFRANDT *et al.*, 2000), até mesmo em condições de hiperglicemia aguda (MARFELLA *et al.*, 2001). A causa para tal alteração tem sido atribuída a neuropatia autonômica (HUANG *et al.*, 2011), um quadro comum no diabetes *Mellitus* e que é resultado de lesão neuronal intrínseca e/ou prejuízo no suprimento de sangue para tais neurônios (BOULTON *et al.*, 2004). A Figura 2 mostra a evolução clínica da neuropatia autonômica cardíaca resultante do diabetes *Mellitus*.

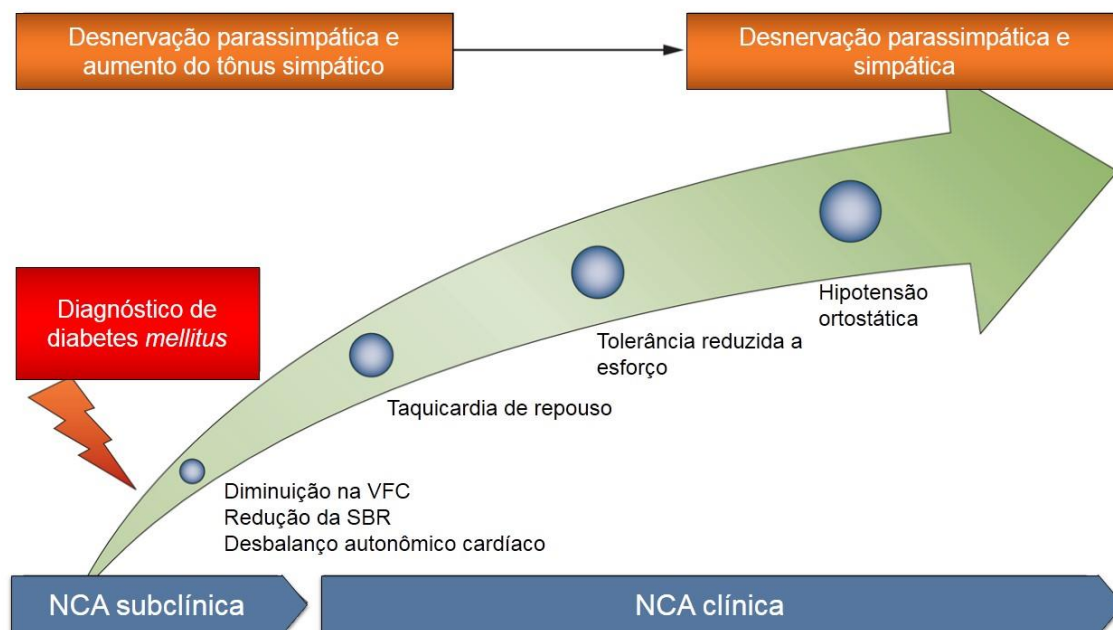


Figura 2 - Progressão da neuropatia autonômica cardíaca (NCA). Os primeiros sinais subclínicos detectáveis são a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e a redução da sensibilidade barorreflexa (SBR). A Denervação parassimpática inicial resulta no aumento do tônus simpático e no surgimento dos primeiros sinais clínicos da NCA. A evolução do quadro leva à desnervação simpática, o que intensifica os sinais clínicos (KUEHL e STEVENS, 2012).

Como esquematizado na Figura 3, as diversas alterações metabólicas presentes no diabetes *Mellitus* levam à ativação de vias formadores de derivados tóxicos, o que acaba por promover a neurotoxicidade. A ativação da via hiperglicêmica poliol, por exemplo, pode afetar a função nervosa tanto por lesão neuronal direta quanto por redução do fluxo sanguíneo neuronal (VALLIANOU *et al.*, 2009). De forma semelhante, a ativação da proteína quinase C também pode causar redução do fluxo sanguíneo neuronal (DOUPIS *et al.*, 2009) e pode resultar em acúmulo de derivados metabólicos tóxicos nos neurônios, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na ativação subsequente da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) e no surgimento de danos neuronais por déficit energético (OBROSOVA, 2002; PACHER *et al.*, 2002).

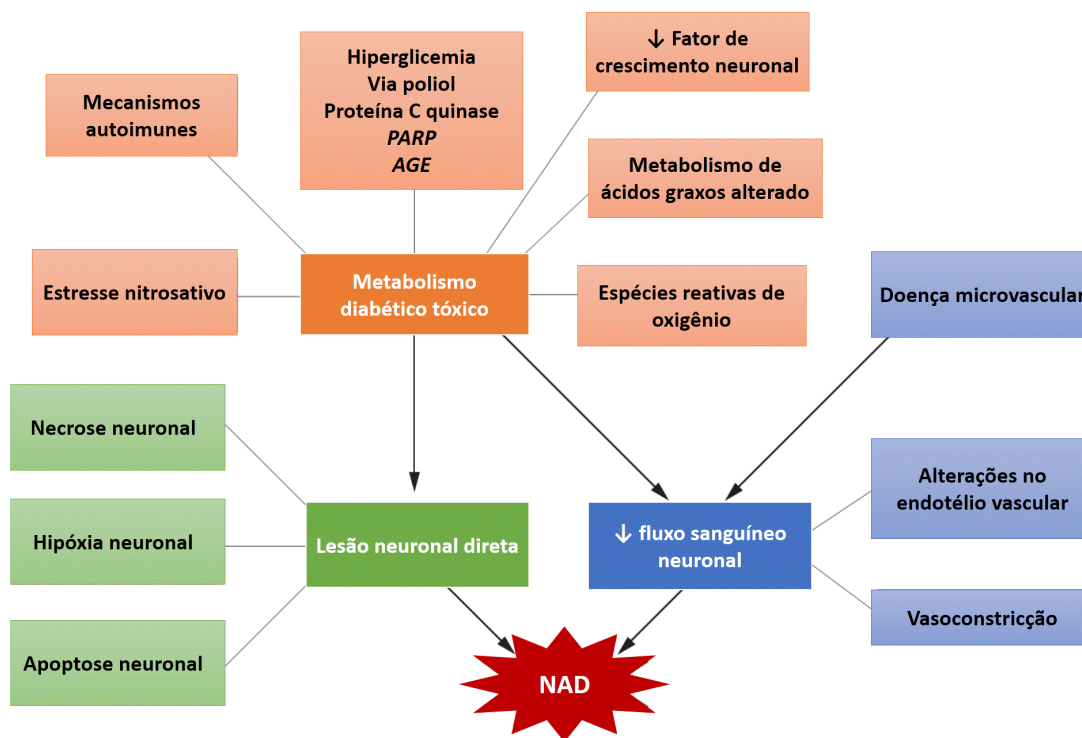


Figura 3 – Patogênese da neuropatia autonômica diabética (NAD). Alterações metabólicas, vasculares e neuronais resultam em comprometimento da função de nervos autonômicos. Abreviações: AGE, produtos de glicação avançada; PARP, poli(ADP-ribose) polimerase. (KUEHL e STEVENS, 2012)

Até o momento, não está totalmente elucidado se as alterações observadas na prole de mães diabéticas são suficientes para também resultar em comprometimento da função barorreflexa ou da função autonômica cardíaca. Em estudo com humanos, De Angelis *et al.* (2001), avaliou a influência do histórico materno de diabetes *Mellitus* sobre o balanço autonômico dos filhos. A função autonômica foi avaliada através da análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca obtida por eletrocardiograma. Os resultados obtidos demonstraram que, em comparação com os indivíduos controles, os filhos de mães diabéticas apresentaram maior tônus simpático e menor tônus parassimpático durante o repouso, mas não houve diferença durante a atividade física. Por outro lado, o estudo de Iellamo *et al.* (2006) não observou diferenças significativas na modulação autonômica cardíaca entre filhos de mãe diabéticas e filhos de mães não diabéticas durante o repouso, sendo identificadas alterações durante a atividade física. Contudo, estudos complementares são necessários para avaliar a importância desses achados a curto e a longo prazo, assim como se faz necessário o acompanhamento da progressão de tal quadro, avaliando os indivíduos do estudo em diferentes idades.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar possíveis alterações no padrão morfofuncional cardíaco de ratos adultos expostos ao diabetes materno.

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos da hiperglicemia gestacional sobre os seguintes parâmetros da prole jovem e adulta:

- Parâmetros metabólicos e biométricos.
- Níveis pressóricos, resposta barorreflexa e a frequência cardíaca intrínseca em animais acordados.
- A contratilidade e o relaxamento ventricular em ratos acordados.
- A contratilidade ventricular e a resposta cardíaca a agonistas adrenérgicos em coração isolado (*in vitro*).
- O perfil morfo-histológico do coração.

Referências Bibliográficas

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SULAIMAN, R. M.; SUBAIH, B. Congenital heart disease in infants of diabetic mothers: echocardiographic study. **Pediatr. Cardiol.**, v. 25, n. 2, p. 137-140, 2004.

AGOUEDEMOS, M. et al. Programming of adult cardiovascular disease following exposure to late-gestation hyperglycemia. **Neonatology**, v. 100, p. 198–205, 2011.

AIRES, M. M.; ARRUDA, A. P.; CASTRUCCI, A. M. L. **Fisiologia**. 3 ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1232, 2011.

ARONSON, D.; RAYFIELD, E. J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. **Cardiov. Diabet.**, v. 1, p. 1-10, 2002.

BARKER, D. J. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v. 341, n. 8850, p.938–941, 1993.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **B.M.J.**, v. 298, p. 564-567, 1989.

BARKER, D. J. et al. Type 2 (noninsulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome x): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36 n. 1, p. 62-67, 1993.

BARKER, D. J. P. et al. Fetal origins of adult disease: strenght of effects and biological basis. **Int. J. Epidemiol.**, v. 31, p. 1235-1239, 2002.

BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 23, p. 588S-595S, 2004.

BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J. Intern. Med.**, v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v. 1, p. 1077–1081, 1986.

BECERRA, J. E. et al. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. **Pediatrics**, v. 85, n. 1, p. 1-9, 1990.

BENNETT, R. A.; PEGG, A. E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. **Cancer Res.**, v. 41, n. 7, p. 2786-2790, 1981.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes Dev.**, v. 23, n. 7, p. 781–783, 2009.

BERTINI, A. M. Diabetes mellitus. In: GUARIENTO, A.; MAMEDE, J. A. V. **Medicina materno-fetal**. São Paulo: Atheneu, 2001.

- BLUE, E. K.; DIGIUSEPPE, R.; DERR-YELLIN, E. et al. Gestational diabetes induces alterations in the function of neonatal endothelial colony-forming cells. **Pediatr. Res.** v. 75, p. 266-272, 2014.
- BO, S. et al. Low birthweight and metabolic abnormalities in twins with increased susceptibility to type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 17 p. 365-370, 2000.
- BOLZAN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res.**, v. 512, n. 2-3, p. 121-134, 2002.
- BOUBRED, F.; BUFFAT, C.; FEUERSTEIN, J. M, et al. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 293, p. 1944–1949, 2007.
- BOULTON, A. J.; MALIK, R. A.; AREZZO, J. C.; SOSENKO, J. M. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*, v. 27, p. 1458–1486, 2004.
- BUNT, J. C.; TATARANNI, P. A.; SALBE, A. D. Intrauterine exposure to diabetes is a determinant of hemoglobin A(1)c and systolic blood pressure in pima Indian children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 3225–3229, 2005.
- CAGLIERO E. et al. Maternal diabetes induces increased expression of extracellular matrix components in rat embryos. **Diabetes**, 42(7):975-980. 1993
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 30-40, 2001.
- CEMACH. **The Confidential Enquiry into Maternal and Child Health.** Diabetes in pregnancy: caring for the baby after birth. Findings of a National Enquiry: England, Wales and Northern Ireland. London, 2007.
- CHEN, S. et al. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. **J. Mol. Cell Cardiol.** v. 32, n. 9, p. 1621-1629, 2000.
- CIANFARANI, S.; GERMANI, D.; BRANCA, F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal**, v. 81, p. 71-73, 1999.
- DABELEA, D. et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. **Diabetes**, v. 49, p. 2208-2211, 2000.
- DAMASCENO, D. C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 72, p. 235-244, 2002.
- DE ANGELIS, C.; PERELLI, P.; TREZZA, R. Modified autonomic balance in offsprings of diabetics detected by spectral analysis of heart rate variability. **Metabolism.**, v. 50, p. 1270–1274, 2001.
- DE BOO, H.; HARDING, J. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Obstet. Gynecol.**, v. 46, n. 1, p. 4-14, 2006.

DEMARINI, S. Impact of metabolic control of diabetes during pregnancy on neonatal hypocalcemia: a randomized study. **Obstet. Gynecol.**, v. 83, p. 918–922, 1994.

DESOYE, G.; HAUGUEL-DE MOUZON, S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. S120-S126, 2007.

DORNER, G.; PLAGEMANN, A.; REINAGEL, H. Familial diabetes aggregation in type I diabetics: gestational diabetes an apparent risk factor for increased diabetes susceptibility in the offspring. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v. 89, p. 84-90, 1987.

DOUPIS, J. et al. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, p. 2157–2163, 2009.

ERICKSSON U. J. et al. Diabetic Embryopathy: studies with animals and in vitro models. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 94-98, 1991.

ERIKSSON, J. et al. Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. **Hypertension**, v. 36, p. 790-794, 2000.

FARAH, V. M.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 32, p. 361-369, 1999.

FETITA, L. S. et al. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 10, p. 3718–3724, 2006.

FOWDEN, A. L.; HILL, D. J. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. **Br. Med. Bull.**, v. 60, p. 123–142, 2001.

FRANKS, P. W. et al. Gestational glucose tolerance and risk of type 2 diabetes in young Pima Indian offspring. **Diabetes**, v. 55, p. 460-465, 2006.

FREINKEL, N. Banting Lecture 1980: Of pregnancy and progeny. **Diabetes**, v. 29, p. 1023–1035, 1980.

FREINKEL, N. Diabetic embryopathy and fuel-mediated organ teratogenesis: lessons from animal models. **Horm. Metab. Res.** v. 20, n. 8, p. 463-475, 1988.

GARCIA-PATTERSON, A. et al. In human gestational diabetes mellitus congenital malformations are related to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 509-514, 2004.

GILLMAN, M. W. et al. Maternal gestational diabetes, birth weight, and adolescent obesity. **Pediatrics**, v. 111, p. 221–226, 2003.

GOLDMAN, A. S. et al. Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. 23, p. 8227-8231, 1985.

GUTIERREZ, J. C. et al. Aortic and ventricular dilation and myocardial reduction in gestation day 17 ICR mouse fetuses of diabetic mothers. **Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.**, v. 79, n.6, p. 459-464, 2007.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Elsevier Ed., RJ 2006.

HAGAY, Z. J. et al. Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 173, n. 4, p. 1036-1041, 1995.

HAIBARA, A. S.; SANTOS, R. A. S. Descobrimento e importância dos barorreceptores. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7, p. 113-115, 2000.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595-601, 1992.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br. Med. Bull.**, v. 60, p. 5-10, 2001.

HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n. 19, p. 1991-2002, 2008.

HARDER, T. et al. Maternal and paternal family history of diabetes in women with gestational diabetes or insulin-dependent diabetes mellitus type I. **Gynecol. Obstet. Invest.** v. 51, p. 160-164, 2001.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 21, p. 203-213. 1987.

HIDEN, U. et al. MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels. **Diabetes**, v. 57, p. 150-157, 2008.

HOLEMANS, K.; GERBER, R. T.; MEURRENS, K. et al. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Diabetologia**, v. 42, p. 81-89, 1999.

HUANG, E. S.; LIU, J. Y.; MOFFET, H. H.; JOHN, P. M.; KARTER, A. J. Glycemic control, complications, and death in older diabetic patients: the diabetes and aging study. **Diabetes Care**, v. 34, p. 1329-1336, 2011.

IELLAMO, F. et al. Concomitant impairment in endothelial function and neural cardiovascular regulation in offspring of type 2 diabetic subjects. **Hypertension**, v. 48, p. 418-423, 2006.

INGRAM, D. A. et al. In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function. **Diabetes**, v. 57, p. 724-731, 2008.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DIABETES AND PREGNANCY STUDY GROUP. Recommendations on diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care.**, v. 33, p. 676-682, 2010.

JAQUET, D. et al. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 48, n. 5, p. 849-855, 2005.

JAQUET, D. et al. Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine retardation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 1041-1046, 2000.

KENSARA, O. A.; WOOTTON, S. A.; PHILLIPS, D. I. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual energy xray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 82 n. 5, p. 980-987, 2005.

KITZMILLER, J. L.; DAVIDSON, M. B. Diabetes e gravidez. In: Davidson MB. **Diabetes mellitus: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Revinter. p. 277-303, 2001.

KNOWLER, W. C. et al. Diabetes incidence and prevalence in Pima Indians: a 19-fold greater incidence than in Rochester, Minnesota. **Am. J. Epidemiol.**, v. 108, p. 497-505, 1978

KUEHL, M.; STEVENS, M. J. Cardiovascular autonomic neuropathies as complications of diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 8, p. 405–416, 2012.

LANFRANCHI, P. A.; SOMERS, V. K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. **Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.**, v. 283, p. 815-826, 2002.

LARGER, E.; MARRE, M.; CORVOL, P.; GASC, J. M. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. **Diabetes**, v. 53, p. 752–761, 2004.

LAW, C. et al. Maternal and fetal influences on blood pressure. **Arch. Dis. Child.**, v. 66, p. 1291–1295, 1991.

LEFRANDT, J. D.; MULDER, M. C.; BOSMA, E.; SMIT A. J.; HOOGENBERG, K. Inverse relationship between blood glucose and autonomic function in healthy subjects. **Diabetes Care**, v. 23, p. 1862-1864, 2000.

LEIPOLD, H. et al. Fetal hyperinsulinism and maternal one-hour postload plasma glucose level. **Obstet. Gynecol.**, v. 104, p. 1301–1306, 2004.

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

LEUSHNER J. R. et al. Analysis of the collagens of diabetic placental villi. **Cell Mol. Biol.**, v. 32, p. 27-35, 1986.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, v. 193, n. 4251, p. 415-417, 1976.

LOFFREDO, C. A.; WILSON, P. D.; FERENCZ, C. Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants. **Teratology**, v. 64, n. 2, p. 98-106, 2001.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found. Symp.**, v. 156, p. 38–50, 1991.

LUO J. et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 47, n. 6, p. 663-668, 1998.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 179–196, 2001.

MACHADO, B. H.; MAUAD, H.; CHIANCA JUNIOR, D. A. et al. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 533-543, 1997.

MADSEN, H.; DITZEL, J. Blood-oxygen transport in first trimester of diabetic pregnancy. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 63, p. 317-320, 1984.

MANDERSON, J. G. et al. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. **Diabetologia**, v. 45, p. 991–996, 2002.

MANDERSON, J. G. et al. Leptin concentrations in maternal serum and cord blood in diabetic and nondiabetic pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 188, p. 1326–1332, 2003.

MARFELLA, R.; VERRAZZO, G.; ACAMPORA, R.; LA, M. C.; GIUNTA, R.; LUCARELLI, C.; PAOLISSO, G.; CERIELLO, A.; GIUGLIANO, D. Glutathione reverses systemic hemodynamic changes induced by acute hyperglycemia in healthy subjects. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. E1167-E1173, 1995.

MAUER, S. M.; STEFFES, M. W.; BROWN, D. M. The kidney in diabetes. **Am. J. Med.**, v. 70, n. 3, p. 603-612, 1981.

MERZOUK, H. et al. Agerelated changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Journal of Lipid. Research**, v. 42, p. 1152-1159, 2001.

METZGER, B. E. Long-term outcomes in mothers diagnosed with gestational diabetes mellitus and their offspring. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 50, n. 4, p. 972–979, 2007.

MEYER-WITTKOPF, M.; SIMPSON, J. M.; SHARLAND, G. K. Incidence of congenital heart defects in fetuses of diabetic mothers: a retrospective study of 326 cases. **Ultrasound Obstet. Gynecol.**, v. 8, n. 1, p. 8-10, 1996.

MIMOUNI, F. et al. Early neonatal predictors of neonatal hypocalcemia in infants of diabetic mothers: an epidemiologic study. **Am. J. Perinatol.**, v. 7, p. 203–206, 1990.

MITANCHEZ, D. et al. The offspring of the diabetic mother—short- and long-term implications **Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 29, p. 256–269, 2015.

MONASTA, L. et al. Early-life determinants of overweight and obesity: a review of systematic reviews. **Obes. Rev.**, v. 11, p. 695-708, 2010.

MURRELL, A.; RAKYAN, V. K.; BECK, S. From genome to epigenome. **Hum. Mol. Genet.**, v. 14, n. 1, p. R3–R10, 2005.

NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype renders detrimental by "progress"? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 353-362, 1962.

NEHIRI, T. et al. Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. **Diabetes**, v. 57, n. 8, p. 2167–2175, 2008.

OBROSOVA, I. G. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 50, p. 3–35, 2002.

ODOM, L. N.; TAYLOR, H. S. Environmental induction of the fetal epigenome. **Expert. Rev. Obstet. Gynecol.**, v. 5, n. 6, p. 657-664, 2010.

PACHER, P. *et al.* The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 514–521, 2002.

PETTITT, D. J. et al. Diabetes and obesity in the offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **Diabetes Care**, v. 16, p. 310-314, 1993.

PETTITT, D. J. et al. Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 242-245, 1983.

PINHEIRO, A. R. et al. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. **Clin. Sci.**, v. 114, p. 381–392, 2008.

PINTER, E.; HAIGH, J.; NAGY, A.; MADRI, J. A. Hyperglycemia-induced vasculopathy in the murine conceptus is mediated via reductions of VEGF-A expression and VEGF receptor activation. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 1199–1206, 2001.

PLAGEMANN, A. ‘Fetal programming’ and ‘functional teratogenesis’: on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. **J. Perinatal Med.**, v. 32, p. 297–305, 2004.

PORTO, N. P. C. et al. Effects of K⁺ channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes.**, v.118, p.360-363, 2010.

POULSEN, P.; VAAG, A. The Intrauterine Environment as Reflected by Birth Size and Twin and Zygosity Status Influences Insulin Action and Intracellular Glucose Metabolism in an Age-or Time-Dependent Manner. **Diabetes**, v. 55, p. 1819-1825, 2006.

RAMOS-ALVES, FE, DE QUEIROZ, DB, SANTOS-ROCHA, J, DUARTE, GP & XAVIER, FE. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 166: 2198-2208, 2012a.

RAMOS-ALVES, F. E. et al. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One*, 7, e50593, 2012b.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*, v. 351, n. 9097, p. 173-177, 1998.

REECE, E. A. et al. HOMKO, C. J.; WU, Y. K. Multifactorial basis of the syndrome of diabetic embryopathy. *Teratology*, v. 54, n. 4, p. 171-182, 1996.

REECE, E. A. et al. The role of free radicals and membrane lipids in diabetes-induced congenital malformations. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, v. 5, n. 4, p. 178-187, 1998.

ROBINSON, R. et al. The relation of fetal growth to plasma glucose in young man. *Diabetologia*, v. 35, p. 444-446, 1992.

ROCHA, S. O. et al. Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. *Pediatr. Res.*, v. 58, p. 1274-1279, 2005.

ROGLIC, G.; UNWIN, N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, v. 87, p. 15-19, 2010.

SACKS, D. A. et al. Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Diabetes Care*, v. 35, n. 3, p. 526-528, 2012.

SACKS, D. A. et al. HAPO Study Cooperative Research Group. Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Diabetes Care*, v. 35, n. 3, p. 526-528, 2012.

SCHMIDT, M. I. et al. Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care*, v. 24, n. 7, p. 1151-1155, 2001.

SERRADAS, P. et al. Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 51, p. 392-397, 2002.

SHERER, D. M.; DIVON, M. Y. Prenatal ultrasonographic assessment of the ductus arteriosus: a review. *Obstet. Gynecol.*, v. 87, p. 630-637, 1996.

SILVERMAN, B. L. et al. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes*, v. 40, n. 2, p. 121-125, 1991.

SIMEONI, U.; BARKER, D. J. Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, v. 14, p. 119-124, 2009.

SKILTON, M. R. Intrauterine risk factors for precocious atherosclerosis. *Pediatrics*, v. 121, p. 570-574, 2008.

SMOAK, I. W. Hyperglycemia-induced TGFbeta and fibronectin expression in embryonic mouse heart. **Dev. Dyn.**, v. 231, n. 1, p. 179-189, 2004.

SMYTH, H. S.; SLEIGHT, P.; PICKERING, G. W. Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man: a quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. **Circ. Res.**, v. 24, p. 109-21, 1969.

SOBNGWI, E. et al. Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. **Lancet**, v. 361, p. 1861–1865, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014**. São Paulo, A.C. Farmacêutica, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus: diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro (Brasil): **SBD**, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Diabetes Mellitus Gestacional. **Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e CFM**, 2006.

STRIDE, A. et al. Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF-1alpha gene mutation carriers. **Diabetes Care**, v. 25, p. 2287–2291, 2002.

TADDEI, S. et al. Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 20, n. 12, p. 193-195, 1992.

TAKASU, N. et al. Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1141-1145, 1991.

TARICCO E. et al. Fetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. **Placenta**, v. 24, p. 343-347, 2003.

TARICCO, E. Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo. **BJOG**, v. 116, p. 1729-1735, 2009.

TAUZIN, L. et al. Characteristics of arterial stiffness in very low birth weight premature infants. **Pediatr. Res.**, v. 60, p. 592–596, 2006.

TIMM, H. J. L. M.; WIELING, W.; KAREMAKER, J. M.; LENDERS, J. W. M. Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. **Journal of Physiology**, v. 553, p. 3-11, 2003.

VALLIANOU, N.; EVANGELOPOULOS, A.; KOUTALAS, P. α-lipoic acid and diabetic neuropathy. **Rev. Diabet. Stud.**, v. 6, p. 230–236, 2009.

VAMBERGUE, A.; FAJARDY, I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. **World J. Diabetes**, v. 2, n. 11, p. 196–203, 2011.

- VARASTEHPOUR, A. et al. Activation of phospholipase A2 is associated with generation of placental lipid signals and fetal obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, p. 248-255, 2006.
- VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S.; CABRAL, A. M. Regulação neural periférica da pressão arterial. **Hiper Ativo**, v. 2, p. 34-44, 1995.
- VEILLE, J. C. et al. Interventricular septal thickness in fetuses of diabetic mothers. **Obstet. Gynecol.**, v. 79, p. 51–54, 1992.
- VERBERNE, A. J.; GUYENET, P. G. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. R1195-R1202, 1992.
- VINIK, A. I.; MASER, R. E.; MITCHELL, B. D.; FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1553- 1579, 2003.
- VOHR, B. R.; BONEY, C. M. Gestational diabetes: the forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? **J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.**, v. 21, n. 3, p. 149–157, 2008.
- VRACHNIS, N. et al. Previous gestational diabetes mellitus and markers of cardiovascular risk. **Int J Endocrinol.** v. 2012, 2012b.
- VRACHNIS, N. et al. Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus. **Int. J. Endocrinol.**, v. 2012, p. 1-12, 2012a.
- WADDINGTON, C. Organisers and Genes. Cambridge University Press. **Cambridge**, 1940.
- WEINDLING, A. M. Offspring of diabetic pregnancy: short-term outcomes. **Semin. Fetal. Neonat. Med.**, v. 14, p. 111–118, 2009.
- WEISS P. A. et al. Longterm follow-up of infants of mothers with type 1 diabetes: evidence for hereditary and nonhereditary transmission of diabetes and precursors. **Diabetes Care**, v. 23, p. 905–911, 2000.
- WEISS U. et al. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. **Diabetologia**, v. 44, p. 209-219, 2001.
- WHITAKER, R. C. et al. Gestational diabetes and the risk of offspring obesity. **Pediatrics**, v. 101, p. 91–97, 1998.
- WIDDOWSON, E. M.; MCCANCE, R. A. A review: new thoughts on growth. **Pediatr. Res.**, v. 9, p. 154–156, 1975.
- WIDNESS, J. A. et al. Increased erythropoiesis and elevated erythropoietin in infants born to diabetic mothers and in hyperinsulinaemic rhesus fetuses. **J. Clin. Invest.**, v. 67, p. 637–642, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva: **World Health Org.**, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. Geneva, **World Health Org.**, 2013.

YU, Z. B. et al. Birth weight and subsequent risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. **Obes. Rev.**, v. 12, p. 525-542, 2011.

Artigo 1

5 ARTIGO 1

Original Research Article

Diabetes Res Clin Pr

Impact of maternal hyperglycemia on the biometric and metabolic parameters of the young and adult offspring

Odair Alves da Silva¹, José Jairo Teixeira¹, Thayane Rebeca Alves dos Santos¹, Fabiano Elias Xavier¹ and Glória Pinto Duarte^{1*}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Brazil

*Correspondence: Glória Pinto Duarte, ¹Department of Physiology and Pharmacology, Centro de Ciências Biológicas, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Brazil. E-mail: duarte.gloria@gmail.com.

Abstract

Aims: The aim of the present study was to characterize the metabolic profile and evaluating the body composition and biometric features in three different ages of offspring from streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods: Pregnant rats were made diabetic on day 7 of gestation by a single dose of streptozotocin (50 mg/kg i.p.). The offspring from diabetic mothers (OD) and from control mothers (OC) were evaluated in three different ages: 6, 12 or 18 month. Body weight and blood glucose were measured monthly. The metabolic parameters were evaluated by glucose tolerance test (GTT), insulin tolerance test (ITT) and measurement of cholesterol (total and fractions), triglycerides and glucose levels in the plasma. Body length, abdominal and thoracic circumference were measured to determine biometric parameters. The relative weight of heart, liver, kidneys and abdominal fat was determined by the formula: organ weight (g) x 100/body weight (g).

Results: The OD rats showed a low birth weight, which was quickly reversed in subsequent months. At adulthood, the OD group presented insulin resistance, impaired glucose tolerance and higher abdominal fat mass. In the same way, the body composition was altered in OD rats, with higher cardiac relative weight and lower relative weight of kidneys. However, neither growth nor the plasma lipid profile was changed.

Conclusions: The data summarized in this study clearly demonstrate that maternal diabetes can induces deep changes not only in the metabolic parameters of the offspring, but also in biometric parameters and even in body composition. The severity of these changes is directly related to age.

Keywords: Fetal programming, Rat offspring, Gestational diabetes, Biometry, Metabolism, Age.

1. Introduction

The prevalence of obesity and type 2 diabetes mellitus (T2D) amongst all age groups has reached alarming levels in the last decades [1]. As a result, more and more women of childbearing age are either obese and/or diabetic during pregnancy. Pregnancy *per se* is a progressively hyperglycemic period, maternal hyperglycemia being necessary for the nutritional needs of the growing fetus [1,2]. However, excessive increase of glycemia and glucose intolerance with onset during pregnancy has been increasingly common and has been classified as a specific type of diabetes, the gestational diabetes mellitus (GDM) [2,3].

Both GDM and pre-gestational diabetes are common complications of human pregnancy, occurring in from 2% to 9% of pregnancies [4]. There is increasing evidence that both forms of diabetes increases the long-term risks for abnormal glucose metabolism, obesity and metabolic disease in offspring [5-7]. Nevertheless, the incidence of such complications is seemingly not dependent on the type of maternal diabetes [8,9]. The offspring predisposition to diabetes, in particular, seems to be more related to the maternal blood glucose level than to diabetes type [10]. In rodent models, prenatal exposure to mild hyperglycemia is associated with normal weight or macrosomia and deficient insulin secretion [11]. On the other hand, exposure to severe hyperglycemia is associated with small size at birth and decrease of insulin action in offspring [12].

Research data also suggest that exposure to a diabetic intrauterine environment is associated with congenital malformations [13]. The kind and severity of organogenesis alterations depend on cell differentiation stage at the time the mother develops diabetes. At the beginning of gestation, organogenesis may be severely affected and inducing diabetic embryopathy as observed in offspring of pregestational poorly controlled diabetic mothers [14]. Oxidative stress, and consequent apoptosis or disturbed organogenesis, may be a general mechanism to explain diabetic embryopathy [15]. The high glucose delivery to embryo increases glucose metabolism and, consequently, increases oxidative stress through hexosamine biosynthetic pathway [16] or hypoxia [17].

Increasing evidence from both epidemiologic and animal studies shows that *in utero* exposure to maternal diabetes is associated with increased risk for overweight and obesity during adulthood. However, most of the information available stems from epidemiological

study without dietary control. Rodent models of maternal diabetes using streptozotocin (STZ) as an inducer of pancreatic beta-cell death are extensively reported in the literature [18,19] and mimics the insulin dependent diabetes. Nevertheless, there is still controversy in the literature about the impact of severe maternal hyperglycemia on the offspring metabolism [6,8], as well as, there is little information about the short and long-term, biometric consequences. The aim of the current study was to characterize the metabolic profile and evaluating the body composition and the biometric features in three different ages of offspring from STZ-induced diabetic rats.

2. Methods

2.1. Animals

The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Pernambuco. All procedures described here were reviewed by Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) and had prior approval from local animal ethics committee (number 23076.020652/2012-24). Wistar rats were used in this study and were maintained in a climate-controlled room under a 12-h alternating light/dark cycle, 20 °C to 22 °C temperature, and 50% to 55% relative humidity. Dry food pellets and water were provided *ad libitum*. Virgin females (200–250 g) were placed with a proven breeder male overnight for mating. Vaginal smears were taken the next morning to check for the presence of sperm. Once sperm was detected, that day was assigned as gestational day 1 and pregnant rats were randomly allocated into control and diabetic groups.

2.2. Experimental protocol

Experimental diabetes was induced on day 7 of gestation by a single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (50 mg.kg⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dissolved in citrate buffer (pH 4.5). Severe diabetes was confirmed forty-eight hours after STZ injection by blood glucose levels above 300 mg.dL⁻¹ measured using a glucometer. Control rats were injected with buffer only (10 mM citrate buffer, pH 4.5). After birth, the offspring were restricted to six animals per mother. For the experimental protocols, only male rats were

used and divided into two groups: offspring from diabetic mothers (OD) and offspring from control mothers (OC). The animals of two groups were evaluated in three different ages: 6, 12 or 18 month and were divided into new subgroups (OD6, OD12 and OD18 from diabetic mothers; OC6, OC12 and OC18 from control mothers). Body weight and blood glucose of the animals were measured monthly.

2.3. Biochemical analysis

At the predetermined age, the animals of all groups were fasted for 12h and were anesthetized with i.p. injection of sodium pentobarbital (50 mg.kg^{-1}). A blood samples was collected from retro-orbital sinus with a glass capillary for the determination of serum total cholesterol (TC) and fractions (HDL-C, LDL-C and VLDL-C), triglyceride (TG) and glucose levels by colorimetric reactions, using the LABTEST[®] enzyme kit. The calculation of LDL was accomplished through the Friedewald formula [20]: $\text{LDL} = (\text{CT} - \text{HDL}) - (\text{TG}/5)$, valid if $\text{TG} < 400 \text{ mg.dL}^{-1}$. The levels of VLDL were calculated by the formula: $\text{VLDL} = \text{TG}/5$.

2.4. Glucose tolerance test and insulin tolerance test

After 12 h fasting, the rats of all groups were anaesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg.kg^{-1}) and tail blood samples were taken before (time 0) and 15, 30, 60, and 120 min. after i.p. administration of a solution containing 50% glucose (2 g.kg^{-1}).

After a new overnight fasting, rats were submitted to insulin tolerance test (ITT), in which, 1.5 IU/kg of regular insulin (Humulina R) was infused intraperitoneally. Blood glucose was measured before and 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min. after insulin infusion. The rate constant for blood glucose disappearance (KITT) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$, and the blood glucose half-time ($t_{1/2}$) was calculated from the slope of the least squares regression of the blood glucose concentration during the linear phase of decline [21]. In both experiments, the blood glucose level was measured using a glucometer (ACCU-CHEK).

2.5. Biometric Measurements

The length (cm) and weight (g) of rats were measured using the non-elastic tape and digital scale, respectively. Body length was measured from the nostril to the tail tip. The body weight and body length were used to determine the body mass index (BMI) = body weight (g)/length² (cm²). The abdominal circumference (AB) was assessed on the largest zone of the rat abdomen and the thoracic circumference (TC) was measured immediately behind the foreleg using a plastic non-extensible measuring tape with an accuracy of 0.1 cm. This data also was used to calculate the AC/TC ratio. The body weight was measured monthly and the specific rate of body mass gain (g/kg) was performed using the following formula: $\Delta M/M\Delta t$, where ΔM represents the gain of body weight during $\Delta t = t_2 - t_1$ and M is the rat body weight at t_1 .

2.6. Dissection of rats

All animals were euthanized by decapitation under isoflurane anesthesia. The heart, liver and kidneys were excised, rinsed with saline, blotted with filter paper and were weighed in digital precision balance. The relative organs weight measurements was determined by the following formula: organ weight (g) x 100/body weight (g). The ventricles were excised and weighed separately from the atria. Then, ventricles were dried for 48 h in a desiccator at 70 °C, and reweighed. The ventricles dry weight to body weight ratio was used as an index of cardiac hypertrophy, as previously reported [22]. Visceral fat mass was assessed by weighing the total perirenal and peri-epididymal adipose tissues. The relative fat mass was determined by the following formula: (perirenal + peri-epididymal fat) (g) x 100/body weight (g). The tibia length was measured using a caliper rule.

2.7. Statistical analysis

All results are reported as mean $\pm$ SEM. Comparisons between OC and OD groups in the experimental results were made by unpaired Student t-test and two-way analysis of variance (ANOVA). *Bonferroni's* test was applied for post-hoc analysis when ANOVA detected a statistical significance for one of the factors. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

In the present study, a several diabetes was induced in pregnant rats through the administration of STZ. The blood glucose obtained was higher than 300 mg/dL (average = 348 mg/dL).

Time-course of BW and biometric parameters of offspring from control and diabetic mothers are shown in the Fig 1A and Table 1, respectively. At birth, the OD group presented body weight, length and BMI significantly lower than OC group ($P < 0.001$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). Such difference was not observed in other evaluated ages (6, 12 or 18 months) ($P > 0.05$) (Table 1). Furthermore, during the monthly measurement of BW, no difference was observed between groups after second month, nevertheless, the AC and AC/TC ratio was increased in OD rats older than 12 months. On the other hand, there was significant difference neither in the TC nor in the tibia length between groups (Table 1). The OD rats had a significantly higher specific rate of body mass gain in the second months of age (Fig. 1B).

Table 2 presented the relative organs weight and relative fat mass. The heart of OD18 subgroup presented a higher relative weight (RW) than that from the OC18 group ($P < 0.01$). On the other hand, the RW of wet and dry ventricles was increased in all OD subgroups. Increased RW also was observed in the fat mass of OD12 and OD18 subgroups ($P < 0.05$) when compared with the age-matched OC rats. There was no significant difference between groups in RW of liver, whereas the kidneys of all OD subgroups had this parameter significantly lower than that of OC subgroups (Table 2).

After a 12 h fasting, serum glucose concentrations of all OD subgroups were significantly higher than those in the age-matched OC subgroups ($P < 0.05$) (Table 3). The time-course of glycemia from the first to eighteenth month of life is presented in the Fig. 2 and shows a significant rise of serum glucose concentrations in OD rats beginning in the fifth month of age. There was no significant difference in plasma lipid profile (cholesterol and TG) between OD and OC groups (Table 3).

Compared to control rats, the OD groups showed an impaired glucose tolerance and insulin resistance during the GTT and ITT, respectively (Fig. 3A to D). The area under curve of blood glucose during GTT was 13, 39 and 34% higher in the OD6, OD12 and OD18

group, respectively, when compared with that of age-matched OC groups. In the ITT, the OD groups presented the KITT values significant lower than that in the OC groups (15, 14 and 18% lower in the OD6, OD12 and OD18, respectively).

4. Discussion

The adverse metabolic effects of maternal diabetes have been extensively studied in experimental animals. Interestingly, little information is available on the relationships between gestational diabetes and biometric parameters of the offspring from STZ-induced diabetic rats. In the same way, there is conflicting information about the impact of maternal hyperglycemia on the metabolic parameters into three different age stages: 6, 12 and 18 months, which matches the final adolescence, young adult and older adult phase in humans, respectively [23].

The main result of the present study demonstrated impaired glucose metabolism and higher abdominal fat mass in the offspring from diabetic mothers. Most expressive alterations were found in older age groups, such as OD12 and OD18 group, what show an age-dependent health impairment. On the other hand, there was no suggestion in this study that diabetes in rat pregnancy “programmes” the fetus to develop dyslipidemia or significantly affect its long-term growth.

Excess fetal growth is a complication that usually affects the offspring of mildly hyperglycemic mothers (glycemia between 120 and 300 mg/dL). Increased nutrients availability from the mother to the developing fetus through the placenta is the possible cause [24]. While maternal glucose freely crosses the placenta, maternal insulin does not, as a result, the fetal pancreas, although immature, is capable of producing increased insulin levels, which acts as a growth hormone and promotes growth and adiposity in the fetus [24,25,26]. Alterations in the delivery of amino acids and upregulation of placental transport systems can also contribute to excessive growth [27,28].

In contrast, the fetuses and newborns of severely hyperglycemic mothers were growth retarded (microsomic). Their pancreatic islet mass was enhanced related to hyperplasia suggesting an overstimulation [29] followed an early exhaustion of their secretory capacity [30]. Therefore, intrauterine growth restriction is attributed especially to

the lack of insulin [31]. However, alterations in the placental structure also can be involved. The severe hyperglycemia can induce a reduction of trophoblast proliferation, which delays placental growth and development [32]. This mechanism could explain not only the intrauterine growth restriction, but also the higher incidence of spontaneous abortion and pre-eclampsia associated with diabetes [33].

In the present study, a severe diabetes was induced in pregnant rats through the administration of STZ. As a result, the newborns were microsomic and presented a lower BMI than control newborns. However, a high rate of body mass gain in the second month led the OD rats to a complete recovery of body weight during the following months. According to the “catch-up growth” hypothesis, proposed by Alan Lucas and Atul Singhal [34,35], early and complete growth recovery of a microsomic newborn is due a rearrangement of the endocrine system at birth, with increase mainly of insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations during the first trimester of postnatal life. On the other hand, tissues chronically depleted of insulin and IGF-I during fetal life and suddenly exposed to increased concentrations of these two hormones shortly after birth, may counteract their additive insulin-like actions by developing insulin resistance as a metabolic defense mechanism to protect the organism from hypoglycemia [36]. In accordance with this, we observed a significant rise of serum glucose concentration in the OD group in subsequent months of complete body weight recovery, being significantly different from that of the OC group after the fifth month of age.

Despite the postnatal higher rate of body mass gain in the OD group, there was no more difference in the body weight between OC and OD rats after two months of age. Nevertheless, this last group showed a tendency to accumulated abdominal fat mass with advancing age, even no significant difference in weight, what result in increase of AC and AC/TC ratio after one year of age. The abdominal fat has been considered more metabolically active than the peripheral adipose tissue and large accumulation of fat in this location may be an important factor in the development of metabolic disorders [37]. Adipokines and inflammatory mediators produced in this tissue may causing chronic subclinical inflammation, which leads to insulin resistance and abnormality in glucose metabolism [1].

Some evidence indicates that intrauterine diabetic environment influences the offspring to being overweight and obese later in life, even in the absence of macrosomia at birth [38]. The mechanisms involved are not fully understood, but there is some suggestion that fetal hyperinsulinemia may be a precursor to overweight in the adulthood. More recently, increases in leptin levels and consequently leptin resistance in the fetus from diabetic mother have been reported [39]. Induction of leptin resistance in utero may therefore be hypothesized as a potential mechanism for later development of obesity in offspring exposed to diabetes in utero (reviewed by Dabelea [40]).

In pregnancy associated with severe hyperglycemia, the resultant low birthweight *per se* has been linked to “developmental programming” whereby sub-optimal growth during pregnancy results in fetal adaptations, including altered organogenesis [41]. According to the “thrifty phenotype hypothesis”, proposed by Hales and Barker [42], the endocrine alterations induced by poor fetal growth are intended to divert the limited nutrient supply to maintain survival and development of vital organs, such as the brain, at the expense of the development of others organs. In the present study, we observed a reduced relative organs weight of kidneys in the OD rats in all ages analyzed, showing that this change persists throughout life.

Organs such as the kidney are at risk as they achieve full quantitative development during late gestation and the perinatal period. Environmental factors, such as hyperglycemia and intrauterine malnutrition alter this process by reducing this quantitative, organ-specific endowment, for example the number of nephrons in the kidney [8]. These alterations may be the price paid for survival and only compromise function later in life, when increasing physiologic requirements, which may be followed by glomerular hypertension, proteinuria, and activation of the renin-angiotensin system, what can leads to a vicious circle of rising blood pressure and further renal damage [43]. In this case, renal damage seem to be caused by apoptosis, increased activity of the intrarenal renin-angiotensin system and increased activity of nuclear factor (NF)-kB signaling pathway [44].

On the other hand, the RW of heart was increased in the OD rats. The dry ventricular relative weight is commonly used as an index of cardiac hypertrophy and was increased in all OD subgroups. This finding is frequently observed in embryologic studies of offspring from STZ-induced diabetic rats [45,46]. However, the postnatal persistence or consequences

of heart hypertrophy remains controversial and represent an important area for further clinical research. In this study, was observed that cardiac hypertrophy not only persists into adulthood, but also worsens with age.

In adult humans, chronic hyperglycemia seems to be the main determining factor to the persistence of cardiac hypertrophy and has been associated with hypertrophic cardiomyopathy, which evolves into a dilated myopathy in the adult heart [47]. In our study, the OD rats presented higher blood glucose levels, impaired glucose tolerance and insulin resistance, which could contribute to cardiac alteration. According to Mauer *et al.*, [48] as a response to hyperglycemia, fibronectin and collagen accumulate in some organs, including the heart. This increase in extracellular matrix (ECM) appears to be mediated by the transforming growth factor beta-1 (TGF β -1), a 25 k-Da protein that when activated mediates an increased production and deficient degradation of ECM molecules [49]. Apart from hyperglycemia, other causes to cardiac hypertrophy in OD group can be involved, such as hypertension or excessive autonomic influences on the heart, which requires further investigation.

The impaired glucose tolerance and fasting hyperglycemia are common outcomes in offspring of hyperglycemic pregnancies. Human and animal studies point to the role of both insufficient insulin production and insulin resistance as possible mechanisms [50]. In the present study, in addition to GTT and ITT, the fasting plasma glucose was measured monthly and showed an age-dependence to the rise of glycemia. Nevertheless, the blood glucose levels remained into prediabetic state throughout the study time. The exact mechanism by which maternal diabetes impairs the insulin function is not fully elucidated. However, there was compelling evidence for the role of epigenetic modifications, what can be transmitted across generations and can contributes to the development of gestational diabetes in next generation, thus promoting a positive feedback loop for this disease (revised by Vrachnis [1]).

5. Conclusions

The data summarized in this study clearly demonstrate that age is a determinant factor in the onset of gestational diabetes outcomes. Whereas a significant difference in body weight was noted only in the first months of life, impairment of glucose metabolism was expressive only in adulthood. The biometric parameters were slightly affected in the adulthood, however, the increase of abdominal fat resulted in high abdominal circumference in older OD rats, moreover, there was a low growth trend. Some organs were affected and had changes in its structure, such as the kidneys, which were underweight, and the heart, which showed ventricular hypertrophy. These findings are consistent with the principle of fetal programming and predispose to diabetic offspring with life-threatening chronic diseases. Therefore, there is an urgent need for the accumulation of specialized knowledge as to the most effective strategies to deal with metabolic disturbances and risk for chronic diseases in the offspring of diabetic mothers.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

6. References

- [1] Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, et al. Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus. *Int J Endocrinol* 2012;2012:549748.
- [2] World Health Organization. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. Geneva, World Health Org 2013.
- [3] American Diabetes Association Standards of medical care in diabetes - 2010. *Diabetes Care* 2010;33:S11–S16.
- [4] Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2005;352:2477–86.
- [5] Hay WW Jr. Care of the infant of the diabetic mother. *Curr Diab Rep* 2012;12:4–15.
- [6] Fetita LS, Sobngwi E, Serradas P, Calvo F, Gautier JF Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(10):3718–24.
- [7] Metzger BE. Long-term outcomes in mothers diagnosed with gestational diabetes mellitus and their offspring. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50(4):972–9.
- [8] Simeoni U, Barker DJ. Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14:119–24.
- [9] Weiss PA, Scholz HS, Haas J, Tamussino KF, Seissler J, Borkenstein MH. Long-term follow-up of infants of mothers with type 1 diabetes: evidence for hereditary and nonhereditary transmission of diabetes and precursors. *Diabetes Care* 2000;23:905–11.
- [10] Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dorner G. Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia* 1997;40:1094–100.
- [11] Gauguier D, Bihoreau MT, Picon L, Ktorza A. Insulin secretion in adult rats after intrauterine exposure to mild hyperglycemia during late gestation. *Diabetes* 1991;40(2):109–14.
- [12] Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1991;34(2):81–5.
- [13] Farrell T, Neale L, Cundy T. Congenital anomalies in the offspring of women with type 1, type 2 and gestational diabetes. *Diabet Med* 2002;19:322–26.
- [14] Kousseff BG. Diabetic embryopathy. *Curr Opin Pediatr* 1999;11:348–52
- [15] Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:2–10.

- [16] Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamaki A, Loeken MR. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:519–27.
- [17] Li R, Chase M, Jung SK, Smith PJ, Loeken MR. Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E591–E599.
- [18] Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976;193(4251):415-17.
- [19] Punareewattana K, Holladay SD. Immunostimulation by complete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, or interferon-gamma reduces severity of diabetic embryopathy in ICR mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70(1):20-7.
- [20] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499–502.
- [21] Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabete Metab* 1987;2:116-21.
- [22] Lahlou S, Lima GC, Leão-Filho CSC, Duarte GP. Effects of long-term pretreatment with isoproterenol on bromocriptine-induced tachycardia in conscious rats. *Can J Pharmacol Physiol* 2000;78:260–5.
- [23] Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013;4:624–30.
- [24] Freinkel N. Banting Lecture 1980: Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 1980;29:1023–35.
- [25] Bihoreau MT, Ktorza A, Kervran A, Picon L. Effect of gestational hyperglycemia on insulin secretion in vivo and in vitro by fetal rat pancreas. *Am J Physiol* 1986;251:E86–E91.
- [26] Ashworth MA, Leach FN, Milner RD. Development of insulin secretion in the human fetus. *Arch Dis Child*, 1973;48(2):151–2.
- [27] Jansson T1, Cetin I, Powell TL, Desoye G, Radaelli T, Ericsson A, et al. Placental transport and metabolism in fetal overgrowth—a workshop report. *Placenta* 2006;27:109–13.
- [28] Ericsson A, Säljö K, Sjöstrand E, Jansson N, Prasad PD, Powell TL, et al. Brief hyperglycaemia in the early pregnant rat increases fetal weight at term by stimulating placental growth and affecting placental nutrient transport. *J Physiol* 2007;581(3):1323–32.

- [29] Aerts L, Holemans K, Van Assche FA. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes Metab Rev* 1990;6:147–67.
- [30] Kervran A, Guillaume M, Jost A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 1978;15:387–93.
- [31] Schaffer SW, Mozaffari MS. The neonatal STZ model of diabetes. In: McNeill JH, editor. *Experimental models of diabetes*. Boca Raton, FL: CRC Press 1999;231–55.
- [32] Weiss U, Cervar M, Puerstner P, Schmut O, Haas J, Mauschitz R, et al. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia* 2001;44:209–19.
- [33] Hiden U, Glitzner E, Ivanisevic M, Djelms J, Wadsack C, Lang U, et al. MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor- α levels. *Diabetes* 2008;57:150–7.
- [34] Singhal A, Lucas A. Early origins of cardiovascular disease: Is there a unifying hypothesis? *Lancet* 2004;363:1642–45.
- [35] Lucas, A. Programming by early nutrition: An experimental approach. *J Nutr* 1998;128:401–6.
- [36] Cianfarani S, Germani D, Branca F. Low birthweight and adult insulin resistance: the “catch-up growth” hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F71–F73.
- [37] Duarte ACGO. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev Nutr* 2006;19:3.
- [38] Pettitt DJ, Knowler WC, Bennett PH. Obesity in offspring of diabetic Pima Indian women despite normal birth weight. *Diabetes Care* 1987;10(1):76–80.
- [39] Manderson JG, Patterson CC, Hadden DR, Traub AI, Leslie H, McCance DR. Leptin concentrations in maternal serum and cord blood in diabetic and nondiabetic pregnancy. *Am J Obstetr Gynecol* 2003;188:1326–32.
- [40] Dabelea D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care* 2007;30(2):S169–S174.
- [41] Barker, D.J. Intra-uterine programming of the adult cardiovascular system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6:106–10.
- [42] Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595–01.
- [43] Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988;1:335–47.
- [44] Tran S, Chen YW, Chenier I, Chan JS, Quaggin S, Hébert MJ, et al. Maternal diabetes modulates renal morphogenesis in offspring. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:943–52.

- [45] Menezes HS, Barra M, Bello AR, Martins CB, Zielinsky P. Fetal myocardial hypertrophy in an experimental model of gestational diabetes. *Cardiol Young* 2001;11(6):609-13.
- [46] Macklon NS, Hop WC, Wladimiroff JW. Fetal cardiac function and septal thickness in diabetic pregnancy: a controlled observational and reproducibility study. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105(6):661-6.
- [47] Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000;87(12):1123-32.
- [48] Mauer SM, Steffes MW, Brown DM. The kidney in diabetes. *Am J Med* 1981;70(3):603-12.
- [49] Smoak IW. Hyperglycemia-induced TGFbeta and fibronectin expression in embryonic mouse heart. *Dev Dyn* 2004;231(1):179-89.
- [50] Silverman BL, Metzger BE, Cho NH, Loeb CA. Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers: relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care* 1995;18(5):611-17.

Figure legends

Fig. 4 - Time-course of body weight (A) and specific rate of body mass gain (B) in the male offspring of controls (OC) and diabetic mothers (OD). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. OD group (Two-way ANOVA followed by post-hoc *Bonferroni* Test). (n = 6-8 for each group).

Fig. 5 - Time-course of fasting plasma glucose from 1 until 18 months of age in the male offspring of controls (OC) and diabetic mothers (OD). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. OC group (Two-way ANOVA followed by post-hoc *Bonferroni* Test). (n = 6-9 for each group).

Fig. 3 - Blood glucose levels during the intraperitoneal glucose tolerance test (A and B) and insulin tolerance test (C and D) in male offspring of controls (OC) and diabetic mothers (OD) evaluated at three different ages (6, 12 and 18 months). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. † $P < 0.05$ vs. OC6; [#] $P < 0.05$ and ^{##} $P < 0.01$ vs. OC12; ** $P < 0.01$ vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc *Bonferroni* Test) (n = 6-10 for each group).

Tables

Table 1 - Biometric parameters in male offspring of controls (OC) and diabetic mothers (OD) evaluated at four different ages, at birth (0), with 6, 12 and 18 months.

Parameters	Groups	Age (months)			
		0	6	12	18
Weight (g)	OC	5.3 ± 0.1	348.0 ± 5.73	389.2 ± 10.6	428.5 ± 13.5
	OD	4.4 ± 0.1†††	367.5 ± 10.7	386.6 ± 12.8	417.7 ± 10.3
Length (cm)	OC	5.5 ± 0.02	43.3 ± 0.2	46.0 ± 0.3	46.1 ± 0.8
	OD	5.3 ± 0.04†	44.2 ± 0.4	45.5 ± 0.4	45.5 ± 0.5
BMI (g/cm ²)	OC	0.174 ± 0.004	0.185 ± 0.004	0.187 ± 0.003	0.201 ± 0.004
	OD	0.152 ± 0.003††	0.187 ± 0.008	0.184 ± 0.005	0.202 ± 0.003
AC (cm)	OC	-	22.0 ± 0.6	27.0 ± 0.5	28.2 ± 0.5
	OD	-	22.5 ± 0.7	28.9 ± 0.4 [#]	30.8 ± 0.5**
TC (cm)	OC	-	18.3 ± 0.5	22.5 ± 0.4	23.2 ± 0.4
	OD	-	18.0 ± 0.5	23.1 ± 0.3	24.2 ± 0.3
AC/TC ratio	OC	-	1.15 ± 0.03	1.19 ± 0.01	1.21 ± 0.01
	OD	-	1.17 ± 0.02	1.24 ± 0.01 [#]	1.28 ± 0.01*
Tibia length (cm)	OC	-	4.25 ± 0.04	4.34 ± 0.04	4.39 ± 0.04
	OD	-	4.12 ± 0.04	4.30 ± 0.03	4.30 ± 0.02

AC - Abdominal circumference, TC - thoracic circumference, BMI - body mass index. Values are expressed as mean ± SEM. †P < 0.05, †† P < 0.01 and ††† P < 0.001 vs OC0; ; # P < 0.05 vs. OC12; * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc *Bonferroni* Test) (n = 6-8 for each group).

Table 2 - Body composition by relative organs weight measurements (organ weight x 100/body weight) of the male offspring of controls (OC) and diabetic mothers (OD) evaluated at three different ages (6, 12 and 18 months).

Organ	Groups	Age (months)		
		6	12	18
Heart (%)	OC	0.275 ± 0.01	0.291 ± 0.007	0.284 ± 0.006
	OD	0.282 ± 0.01	0.298 ± 0.01	0.322 ± 0.004**
Wet ventricles (%)	OC	0.209 ± 0.005	0.203 ± 0.009	0.232 ± 0.002
	OD	0.235 ± 0.006†	0.233 ± 0.006 ^{###}	0.261 ± 0.01*
Dry ventricles (%)	OC	0.49 ± 0.01	0.42 ± 0.005	0.39 ± 0.003
	OD	0.54 ± 0.01†	0.47 ± 0.007 [#]	0.50 ± 0.01***
Liver (%)	OC	2.54 ± 0.2	2.77 ± 0.1	3.00 ± 0.1
	OD	2.51 ± 0.2	2.58 ± 0.1	2.79 ± 0.1
Kidneys (%)	OC	0.669 ± 0.03	0.777 ± 0.03	0.749 ± 0.01
	OD	0.547 ± 0.03†	0.692 ± 0.01 [#]	0.704 ± 0.01*
Perirenal fat and epididymal fat (%)	OC	2.21 ± 0.1	2.24 ± 0.1	2.59 ± 0.1
	OD	2.34 ± 0.2	2.92 ± 0.2 [#]	3.52 ± 0.2*

Values are expressed as mean ± SEM. †P < 0.05 vs. OC6; [#] P < 0.05 and ^{###} P < 0.001 vs. OC12; *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc *Bonferroni* Test) (n = 6-10 for each group).

Table 3 – Plasmatic Biochemical Parameters in male offspring of controls (OC) and diabetic mothers (OD) evaluated at three different ages (6, 12 and 18 months).

Parameters (mg/dL)	Groups	Age (months)		
		6	12	18
Glucose	OC	68,8 ± 3.9	85.4 ± 1.9	85.7 ± 1.7
	OD	82,1 ± 4,4†	99.1 ± 3.6 ^{##}	103.3 ± 3.4 ^{***}
Triglyceride	OC	46.4 ± 3.8	71.1 ± 5.0	183.9 ± 20.9
	OD	49.5 ± 6.5	76.2 ± 3.7	151.5 ± 11.9
Total Cholesterol	OC	45.9 ± 6.2	63.4 ± 3.8	90.6 ± 11.8
	OD	36.8 ± 2.4	61.2 ± 6.9	91.1 ± 9.0
HDL-C	OC	28.1 ± 1.2	33.3 ± 2.9	39.0 ± 1.7
	OD	28.1 ± 1.0	36.3 ± 2.8	36.4 ± 2.3
LDL-C	OC	11.8 ± 1.8	22.3 ± 4.6	28.6 ± 6.3
	OD	9.7 ± 2.3	15.7 ± 5.2	23.0 ± 3.1
VLDL-C	OC	6.7 ± 0.5	10.8 ± 0.6	35.1 ± 3.8
	OD	7.2 ± 1.2	11.7 ± 0.5	30.2 ± 2.3

HDL-C - high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C - low-density lipoprotein cholesterol, VLDL-C – very low-density lipoprotein cholesterol Values are expressed as mean ± SEM. † $P < 0.05$ vs. OC6; ^{##} $P < 0.01$ vs. OC12; ^{***} $P < 0.001$ vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc *Bonferroni* Test) (n = 6-7 for each group).

Figures

Figure 1

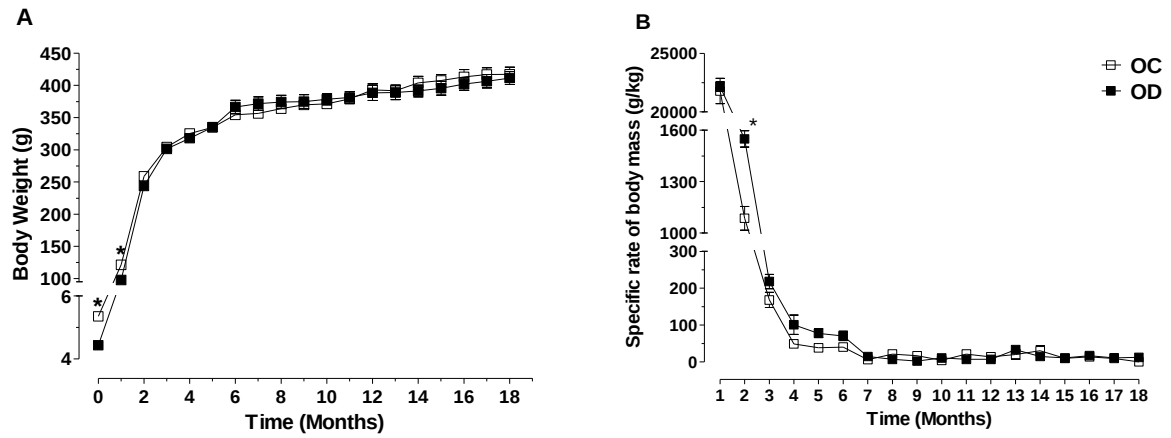


Figure 2

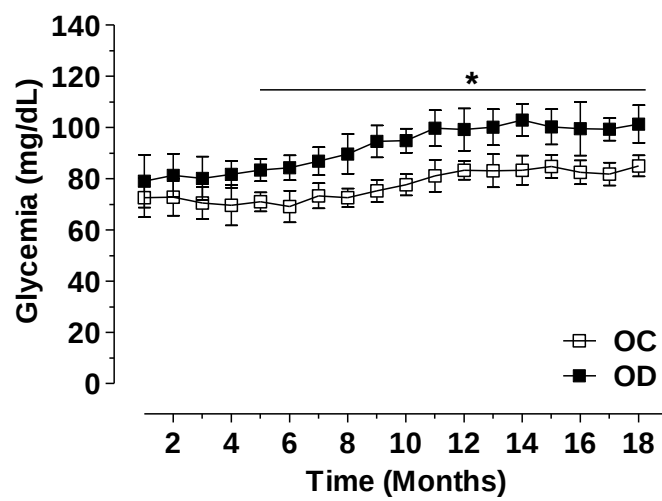
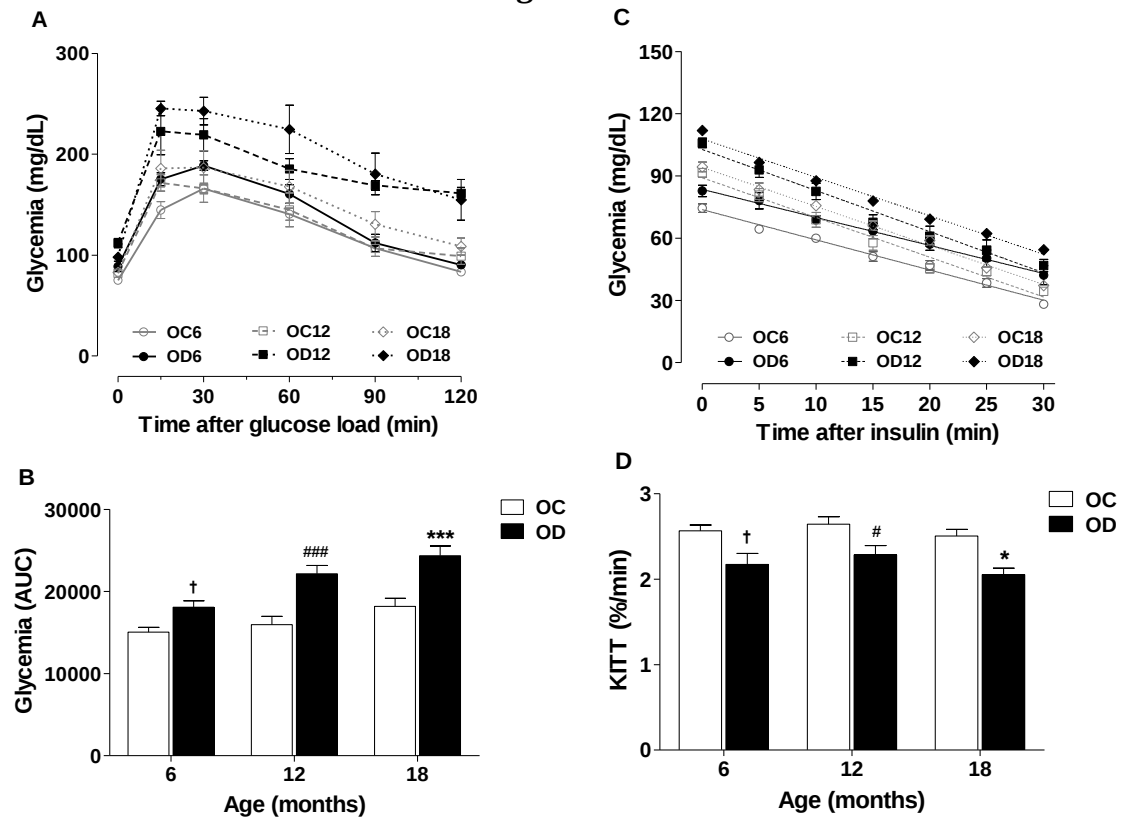


Figure 3



Artigo 2

6 ARTIGO 2

Original investigations

J Diabetes Res

Maternal hyperglycemia induces autonomic dysfunction and heart failure in older adult offspring

Odair Alves da Silva¹, Fabiano Elias Xavier¹ and Glória Pinto Duarte^{1*}

¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Brazil

*Correspondence: Glória Pinto Duarte, Department of Physiology and Pharmacology, Centro de Ciências Biológicas, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Brazil. E-mail: duarte.gloria@gmail.com.

Abstract

Background: Gestational diabetes is a pathologic state that increases the incidence of complications in both mother and fetus. Offspring thus exposed to an adverse fetal environment may manifest increased susceptibility to a number of chronic diseases later in life, including cardiovascular and metabolic abnormalities that are known to increase the risk of premature death. In the present study, we evaluated the cardiovascular function in three different ages of offspring from diabetic rats.

Methods: Diabetes mellitus was induced in pregnant rats on day 7 of gestation by a single dose of streptozotocin (50 mg/kg). The offspring from diabetic (OD) and control rats (OC) were evaluated in three different ages: 6, 12 or 18 months. Cardiac function was evaluated in conscious rats (by ventricular catheterization) and *in vitro* (by isolated heart assay). Baroreflex response to phenylephrine (PHE) or sodium nitroprusside (SNP) was determined by linear regression method. Cardiac sympathetic and parasympathetic influences were evaluated by autonomic blockade. Ventricular index of hypertrophy was determined by the heart dry weight to body weight ratio.

Results: Fasting glycemia, mean arterial pressure and sympathetic tonus was increased in the OD rats at 12 (OD12) and 18 (OD18) months of age. OD groups showed an age-related impairment of baroreflex control of heart rate, with impaired baroreflex-mediated tachycardia and inotropic response in OD12 and OD18 rats. Impaired baroreflex-mediated bradycardia was present only in OD18 rats. During cardiac function evaluation *in vivo*, were observed low left ventricular systolic pressure and $+dP/dT$ in the OD18 rats, showing a systolic dysfunction. In all OD groups was observed high left ventricular end diastolic pressure, showing a diastolic dysfunction. Furthermore, all OD rats also presented a high ventricular index of hypertrophy and isolated hearts from OD12 and OD18 rats showed a decreased sensibility to isoproterenol.

Conclusions: The present study demonstrates that gestational diabetes may favor the onset of hyperglycemia, hypertension and heart failure in older age of offspring, what are important risk factors to death. Therefore, is of utmost importance an optimal glycemic control in diabetic pregnancy as key to prevent cardiovascular disease in older age of offspring.

Keywords: Maternal diabetes, Autonomic function, Hyperglycemia, Heart failure.

Introduction

There are strong evidences that exposure to hyperglycemia in utero not only has short-term consequences, but long-term too, which include cardiovascular disease and metabolic alterations [1,2]. Both animal studies and epidemiologic investigations have found cardiovascular abnormalities in adult offspring of hyperglycemic mothers, what is consistent with the hypothesis of fetal programming initially described by Barker *et al.* [3,4].

For many years, the gestational diabetes mellitus (GDM) has been defined as “any degree of glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy” [5,6]. Recently, the new consensus of American Diabetes Association [7] defines GDM as “diabetes diagnosed during pregnancy that is not clearly overt diabetes” and provides diagnostic thresholds for fasting and post-glucose loading values. Current definitions include women with diabetes and women with intermediate hyperglycemia – impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia as defined in non-pregnant adults. The diagnostic criteria to GDM proposed in 2010 by the International Association of Diabetes and Pregnancy Groups [8] is still the most recommended and is mainly based on the 75 g oral glucose tolerance test (≥ 92 , 180 and 153 mg.dL⁻¹ for fasting, one-hour and two-hour plasma glucose concentration respectively) [6].

Animal models to study the developmental programming effects of in utero exposure to hyperglycemia have been described and have allowed studying the long-term cardiovascular sequelae (reviewed by Simeoni and Barker [2]). Rodent models of maternal diabetes using streptozotocin (STZ) as an inducer of pancreatic beta-cell death are extensively reported in the literature [9-11] and mimics the insulin dependent diabetes [9]. Aberrant metabolic fuels present during hyperglycemia and hyperketonemia are toxic factors for the developing embryo. Oxidative stress also has been proposed to contribute significantly to teratogenesis and morphological changes of the heart [12-14].

Functional outcomes to the cardiovascular system also are reported, our laboratory has recently presented some vascular alterations in aorta and mesenteric resistance arteries from the offspring of diabetic rats [15-17]. Other research data also suggest that exposure to a diabetic intrauterine environment during pregnancy is associated with functional disorders of the heart, such as impairment of sympathetic control of the sinoatrial node [18] and

systolic and diastolic heart failure [19]. However, a large part of the existing studies is directed to fetuses and newborns of diabetic mothers [12,14]. There is still little information about the GDM consequences for cardiac function in young and adult offspring, suggesting the need for efforts in this regard. The goal of the current study was to characterize cardiac function in three different ages of offspring from STZ-induced diabetic rats.

Methods

Animals

The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Pernambuco. All procedures described here were reviewed by Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) and had prior approval from local animal ethics committee (number 23076.020652/2012-24). Wistar rats were used in this study. The animals were maintained in a climate-controlled room under 12-h alternating light/dark cycle, 20 to 22°C temperature, and 50 to 55% relative humidity. Dry food pellets and water were provided *ad libitum*. Virgin females (200 – 250 g) were placed with a proven breeder male overnight for mating. Vaginal smears were taken the next morning to check for the presence of sperm. Once sperm was detected, that day was assigned as gestational day 1 and pregnant rats were randomly allocated into control and diabetic groups.

Diabetes Induction

Experimental diabetes was induced on day 7 of gestation by a single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (50 mg.kg⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dissolved in citrate buffer (pH 4.5). Several diabetes was confirmed 48 hours after STZ injection by blood glucose levels above 300 mg.dL⁻¹. Control rats were injected with buffer only (10 mM citrate buffer, pH 4.5). After birth, the offspring were restricted to six animals per mother. For the experimental protocols, only male rats were used and divided into two groups: offspring from diabetic mothers (OD) and offspring from control mothers (OC). The animals of two groups were evaluated in three different ages: 6, 12 or 18 month (OD6, OD12 and OD18 from diabetic mothers; OC6, OC12 and OC18 from control mothers). The body weight (BW) and fasting glycemia of all groups were taken at the beginning of experimental protocols.

Catheterization procedure

The catheterization procedures aimed to evaluate the arterial blood pressure, baroreflex sensitivity, cardiac autonomic influences and left ventricular function. For this, all experimental groups were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg.kg^{-1} , i.p.) and three vascular catheters (PE-10 fused to PE-50) were implanted as follows: the first catheter were inserted into the abdominal aorta via the left femoral artery for recording the arterial blood pressure. The second catheter was inserted into the inferior vena cava via the left femoral vein for intravenous (i.v.) drug administration. The third catheter was inserted into the right carotid artery and advanced into the left ventricle (LV). All catheters were filled with heparinized (125 IU.mL^{-1}) isotonic saline and exteriorized at the dorsal neck level. Postoperatively, all rats received antibiotics (penicillin, 20,000 U) and were housed individually in plastic cages and allowed to recover for 24 h before any circulatory experiments. All experiments were performed on conscious and freely moving rats.

Hemodynamic and left ventricular function evaluations

One day after the catheterization procedure, animals were maintained in a quiet room and the arterial and LV catheters were connected to a physiological pressure transducers (Model MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) and recorded using an interface and software for computer acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Rats were conscious and unrestrained during the experiment. The experimental environment was kept as quiet as possible to avoid any interference in the studied parameters. The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in LV and arterial pressure. The following data were obtained: Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), LV systolic pressure (LVSP), LV end-diastolic pressure (LVEDP), maximum rate of LV pressure rise and fall ($+dP/dt$ and $-dP/dt$). The baseline measurements for these parameters were recorded for at least 30-45 min before drug administration.

Baroreflex sensitivity and cardiac sympathetic and parasympathetic influences

After a baseline measurements period, baroreflex function was determined using linear regression by plotting the reflex HR changes against the changes in blood pressure elicited by bolus injections of increasing doses of phenylephrine (PHE, $0.25\text{--}4 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$, i.v;

Sigma) or sodium nitroprusside (SNP, 0.5-8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, i.v.; Sigma). PHE infusions were started first, and after MAP and HR returned to control baseline, SNP infusions were begun. Values baroreflex responsiveness were calculated separately from each rat and a slope of the regression line was used as the index for each PHE or SNP test. Cardiac sympathetic and parasympathetic influences and the intrinsic heart rate (IHR) were evaluated based on the chronotropic effects of methylatropine (muscarinic receptor blocker, 1 mg.kg^{-1} , i.v.; Sigma) and atenolol (β -adrenergic receptor blocker, 1 mg.kg^{-1} , i.v.; Sigma) with an interval of 15 minutes between injection of one and the other drug. The next day, the evaluation was repeated with the reverse order of drug administration and HR recorded 15 min after injection of the second antagonist was considered as IHR, as previously described [20,21]. The IHR of each animal was calculated from the mean of the two measurements performed. Cardiac sympathetic tone was estimated by the difference between HR after methylatropine and IHR, while vagal tone was taken to be the difference between IHR and HR after atenolol.

Determination of cardiac hypertrophy

After the circulatory experiments, animals of all groups were anesthetized with inhaled isoflurane, sacrificed by decapitation and the hearts were excised. The hearts were then rinsed with saline and blotted with filter paper. They were weighed, dried for 48 h in a desiccator at 70°C, and reweighed. The heart dry weight to body weight ratio was used as an index of cardiac hypertrophy, as previously reported [21].

Langendorff Heart Preparation

For this experiment, another set of rats was used. The animals were heparinized intraperitoneally (1,400 U. kg^{-1}), anesthetized with inhaled isoflurane and sacrificed by decapitation. After thoracotomy, hearts were quickly excised and arrested in ice-cold perfusion medium. After removal of lung and fat tissue, hearts were immediately mounted and perfused according to the Langendorff technique at a constant perfusion pressure of 80 mmHg. Retrograde perfusion of the aorta was achieved with filtered (Millipore; 0.65 μm), modified Krebs-Henseleit solution (pH 7.4) containing (mM): NaCl 129, KCl 5.6, MgCl_2 1.25, NaHCO_3 21, CaCl_2 1.25 and NaH_2PO_4 1.2. Glucose (10 mM) was added as a substrate. Sodium pyruvate (2 mM) was added as a cosubstrate to preserve myocardial performance during the perfusion period [22]. This buffer was continuously aerated with 5% CO_2 in oxygen and maintained at 37°C. A water-filled latex balloon was inserted into the LV via an

opening in the left atrium. Left ventricular pressures, HR and coronary perfusion rate were simultaneously recorded using a PowerLab 4/35 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) for later analysis. After baseline measurements period of 30-40 min, ventricular function curves were obtained by measuring the LVSP that developed while LV diastolic pressure (LVDP) was increased from 0 to 30 mmHg in 5 mmHg steps (Frank-Starling mechanism). Subsequently, the LVDP was set at 10 mmHg and the effect of increasing bolus (0.1 ml) concentration of isoproterenol (10^{-10} to 10^{-4} M) on the LVSP and HR were studied in isolated, perfused heart preparations from OC and OD groups.

Statistical analysis

All results are reported as mean $\pm$ SEM. Changes in absolute MAP, HR, +dP/dT and -dP/dT with respect to individual baseline values were computed. Comparisons between OC and OD in the experimental results were made by two-way analysis of variance (ANOVA). Bonferroni's test was applied for post-hoc analysis when ANOVA detected a statistical significance for one of the factors. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Animals

In the present study, STZ administration induced a several hyperglycemia (average 348 mg.dL^{-1}) and caused typical characteristics of diabetes mellitus, including hyperglycemia, polyuria, and weight loss in the pregnant rats. The Glycemia was increased in OD rats compared with OC rats in all ages evaluated ($p < 0.05$) whereas BW was similar between the groups ($p > 0.05$) (Table 1). The mortality rate was very high in diabetic rats. Thirteen percent of OD rats died between 12 and 18 months of age versus only 1% in the control rats (data not shown). The ventricle dry weight to body weight ratio was significantly increased in all OD rats, when compared to OC rats (Table 1).

Hemodynamic, left ventricular function and autonomic evaluation

Hemodynamic and autonomic evaluations are presented in Table 2. Under basal conditions, OD12 and OD18 rats showed levels of SAP and MAP higher from those of the age-matched control rats ($p < 0.05$). Furthermore, the OD18 group also presented increased

DAP levels when compared to OC18 group ($p < 0.05$). The HR and IHR (obtained after methylatropine plus atenolol treatments) were not significantly different between groups ($p > 0.05$) (Table 2).

Invasive LV function data, performed in conscious rats, demonstrated impairment of ventricular function in the offspring of diabetic rats. However, this alteration was expressive only in the OD18 group, which had a reduction of LVSP (9%), $+dP/dT$ (25%) and $-dP/dT$ (30%) in relation to the age-matched control group at baseline. The LVEDP, an index of congestive heart failure was significant increased in all OD subgroups when compared with that in OC rats (Table 2).

The cardiac sympathetic and parasympathetic influences were assessed with infusion of single dose of methylatropine or atenolol. In OD12 and OD18 group was observed a higher sympathetic tone when compared with the age-matched control groups. However, cardiac vagal tone was not significantly different between the groups (Table 2).

Baroreflex sensitivity test

In the baroreflex sensitivity test (evaluated by tachycardic, bradycardic, inotropic and lusitropic responses), increasing bolus doses of i.v. injected PHE or SNP evoked dose-dependent increases and decreases in MAP, respectively. In both groups, the pressor effects elicited by PHE evoked the expected reflex bradycardia, the opposite response was observed with SNP administration. In this way, OD groups showed an age-related impairment of baroreflex control of heart rate as indicated by the slope for reflex of tachycardic and bradycardia. As shows in the Figure 1 and 2, there was no difference in the baroreflex response between 6-months-old groups (OC6 vs OD6, $p > 0.05$). On the other hand, the tachycardia response to crescent doses of SNP became attenuated in OD12 and OD18 rats compared with those from controls with same age ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 1A and B). Furthermore, the inotropic index variation ($\Delta+dP/dT$) (Figure 1C and D) and lusitropic index variation ($\Delta-dP/dT$) (Figure 1E and F) were attenuated in older OD rats during SNP administration. In the same way, the bradycardic response evoked by crescent doses of PHE was decreased in OD12 and OD18 rats compared to age-matched control rats ($p < 0.01$) (Figure 2A and B). The inotropic index variation also was attenuated during PHE administration but only in OD18 subgroup ($p < 0.01$) (Figure 2C and D). There was no

difference between lusitropic index variation of the groups during PHE administration (Figure 2E and F).

Isolated, perfused rat hearts assay

Baseline values of LVSP were similar between OD and OC with 6 or 12 months of age. However, were significantly ($p < 0.05$) reduced in OD18 (78.94 ± 2.98 mmHg) when compared with OC18 rat hearts (88.21 ± 2.70 mmHg) (Table 3). Furthermore, resting maximum rates of rise (+dP/dt max) and fall (-dP/dt max) in LV pressure were also impaired in the OD18 rats ($p < 0.05$). The HR was not different between OD and age-matched OC groups (Table 3). Induction of the Frank-Starling mechanism was used to investigate the intrinsic inotropic response of the cardiac muscle. Increment of LVDP from 0 to 30 mmHg produced a similar increase in the LVSP in OD and age-matched control rats ($p > 0.05$), although the pressor effect tended to be lower in OD groups (Figure 3A and B). In the same way, pressure derivatives (+dP/dT and -dP/dT) showed a similar behavior as the ventricular pressure in the OC and OD groups (data not shown).

As expected, isoproterenol infusion evoked concentration-dependent increase in LVSP and HR (Figure 4), however the positive inotropic response was significantly reduced in the hearts of OD12 (at a concentration of 10^{-4} M) and OD18 rats (at concentration of 10^{-6} and 10^{-4} M) compared with age-matched control hearts (Figure 4C and E). In the evaluation of chronotropic response to isoproterenol, measured by percentage of maximal increase in the HR, was observed a lower response in the heart of OD18 rats at concentration of 10^{-6} and 10^{-4} M (Figure 4F).

Discussion

The present study demonstrated that exposure to a hyperglycemic in utero environment results in changes in cardiac function that persist into adulthood and worsen with advancing age. No study, to our knowledge, has followed these offspring into three different age stages (6, 12 and 18 months), which matches the final adolescence, young adult and older adult phase in humans, respectively [23]. This study also is the first that evaluated the ventricular performance in conscious offspring of diabetic rats during the basal period and during the baroreflex sensitivity test. Specifically, we found that, compared to controls, OD18 rats had hyperglycemia, high blood pressure, autonomic dysfunction, diminished left

ventricular function in vivo and in the perfused heart along with a decreased sensitivity to the adrenergic agonist. Less expressive alterations were observed in OD rats with six months and one year of age, showing an age-dependent impairment of cardiovascular function.

Many studies [2,24,25] have shown that offspring of diabetic mothers have higher incidence of impaired glucose tolerance, this constituting a well-known prediabetic state. Hyperglycemia by itself appeared to be a prominent factor in the development of cardiovascular disorders and autonomic dysfunction [26-28]. However, other important factors, such as the presence of high levels of insulin may be involved [29]. Excessive insulin secretion is normally present in the insulin resistant subjects and has been suggested to regulate the peripheral vascular resistance directly [30] and activating the sympathetic nervous system (SNS) [31], what can result in hypertension [32]. In our study, hypertension was observed only in rats over 1 year of age, showing that the onset of this alteration can be associated to duration of exposure to dysglycemia. This finding corroborates with that observed by Rocha *et al.* [33], which found hypertension in the offspring with 12 months of age. However, other experimental studies have not observed hypertension in this model [18,33].

Vascular abnormalities may be involved in the hypertension observed in this model, in recent publications of our laboratory was observed an increase in the production of prostanoids vasoconstrictors derivatives of COX-2 in the rats from diabetic mothers, especially the TxA_2 , PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$, which reduced the endothelium-dependent relaxation and increased noradrenergic responsiveness in the mesenteric bed [15,16]. In another study, our group demonstrated a decreased relaxation induced by acetylcholine directly related with an impaired activity of K_{ATP} channels [17]. Renal disorders also can be the cause of the hypertension observed in these animals. According to Rocha *et al.* [33] the offspring from diabetic mothers present the glomerular filtration rate and renal plasma flow significantly decreased when compared with control offspring.

Besides hypertension, hyperactive SNS can be identified as cause of specific cardiac alterations. The sympathetic adrenergic system plays a central role in ability to rapidly respond to various types of threats. One important target of adrenergic stimulation is the heart, where activation of β -adrenergic receptors (β -AR) causes increases in heart rate (chronotropy), in relaxation speed (lusitropy) and in contractility (inotropy) [35].

Hyperactivity and elevated norepinephrine spillover, possibly culminating in sympathetic denervation and reduced capacity for norepinephrine release. Thus, acute sympathetic activation evokes increased heart rate and contractility, whereas chronic activation can depress SNS sensitivity [36]. In this study, OD rats with 12 and 18 months of age showed a low cardiac response to adrenergic stimulation that could be observed both in baroreflex sensitivity test as in the isolated heart assay. In these rats, baroreflex-mediated tachycardia and inotropic response (after SNP infusions) were attenuated. Similar results were observed in the isolated heart, where low chronotropic and inotropic response to β -adrenergic agonist (isoproterenol) were observed in these groups. This decrease in adrenergic response may be due to changes in expression and/or signaling of β -AR, since the persistent elevation of SNS signalization evokes downregulation of cardiomyocyte β_1 -adrenoceptors, and a shift in the isoform population to promote G_i -coupled β_2 -adrenoceptors [37]. According to Corbi et al. [38], increased adrenergic drive also is a major factor influencing the development of pathological cardiac hypertrophy, a stage that is mediated by β_2 -adrenoceptors and precedes overt heart failure. In the present study, ventricular hypertrophy was evaluated by the weight of ventricle dry to body weight ratio and was observed a significant increase in this ratio in all OD subgroups, when compared with age-matched OC subgroups. Our results were consistent with those of previous studies performed in hyperglycemic rats [35,39].

In the OD animals, besides impaired baroreflex-mediated tachycardia, was found a reduced baroreflex-mediated bradycardia during crescent doses of PHE but only in OD12 and OD18 subgroups, what can be resulted of autonomic neuropathy affecting vagal nervous. Diabetic autonomic neuropathy is a late stage complication of prolonged prediabetic hyperglycemia state characterized by the development of neuroaxonal dystrophy, a swelling of distal neuronal axons without relative neuron loss [40]. Accumulation of advanced glycation end products, activation of apoptotic signals, oxidative stress, and elevated basal firing rate contribute to the degeneration of autonomic neurons [41]. Cardiovascular autonomic neuropathy has been considered an important determinant of mortality in diabetic patients independently of other known risk factors [42], what may be the cause of elevated mortality in the OD group in the present study.

Infusions of PHE also evoked a positive inotropic response as indicated by inotropic index variation (Figure 2C and D). This can be resulted by direct activation of myocardial α_1 -adrenoceptor. In contrast to the effects mediated by myocardial β_1 -adrenoceptor

stimulation, activation of post junctional α_1 -adrenoceptor in the myocardium increases contractile force with little or no change in cardiac rate stimulation transduces signals, principally via changes in intracellular free calcium [43,44]. The OD18 subgroup had an attenuation in the inotropic response evoked by PHE administration, what may be due to changes in expression and/or signaling of α -AR, however, confirmatory studies are required.

In our experiments, direct measurements of cardiac function *in vivo* showed an impairment in the diastolic and systolic LV function of OD rats. In conscious OD18 rats, LV function evaluation evidenced reduced LVSP and reduced $+dP/dt$, reflecting a systolic dysfunction. Increased LVEDP was observed in all OD groups, showing a diastolic dysfunction. Moreover, attenuated $-dP/dt$ was also present only in OD18 subgroup. These alterations in cardiac function are similar to those found in the neonatal period in human offspring of diabetic mothers [45]. By echocardiography, Agoudemos et al. [19] observed abnormal systolic and diastolic cardiac function in the male offspring of diabetic rats. According to Zile *et al.* [46], diastolic dysfunction is not only a defect in active relaxation, but also in passive stiffness of the left ventricle due to cardiac hypertrophy and fibrosis.

LV function impairment was also observed in the isolated, perfused hearts. Although had no significant differences between groups in the intrinsic inotropic responses evaluated by Frank-Starling mechanism, baseline values of LVSP, $+dP/dT$ and $-dP/dT$ were significantly reduced in the hearts of OD18 rats, showing a time-dependent course of the cardiac function impairment, since these changes were not seen in the other OD subgroups. However, extrinsic inotropic responses evoked by β -adrenergic agonist (isoproterenol) was clearly impaired not only in the OD rats with 18 months, but also with 12 months of age. These results corroborate the results obtained during the baroreflex sensibility test and indicate a decrease in density and/or response of β -AR.

These cardiac alterations evidenced in OD rats are predictive of subsequent chronic heart failure [47] and could be the cause of the higher mortality rate observed in this group. According to Vasan *et al.* [48], diastolic heart failure can increase the mortality about 8% and systolic dysfunction can increase about 20% when compared with the control group. In the present study, diastolic function was impaired early, in OD rats at 6 months, whereas systolic dysfunction occurred late in OD rats with 18 months. Thus, the early detection of diastolic and systolic dysfunction can prevent worsening of this condition.

Conclusions

In conclusion, the present study demonstrates that gestational diabetes may favor the onset of hyperglycemia, hypertension and heart failure in older age of offspring. Our results were consistent with those of some previous studies in diabetic subjects and clearly demonstrated that elevated blood glucose levels, even in the prediabetic state, could be a contributing factor in the determination of later autonomic and cardiovascular abnormalities. At the first time, the offspring of STZ-induced diabetic rats was evaluated in three different stages of life, which showed substantial differences in cardiac impairment. Sympathetic hyperactive clearly affect the cardiac function and can be the principal cause of ventricular hypertrophy and baroreflex impairment. Moreover, systolic and diastolic dysfunction was observed in conscious OD rats and confirmed in the isolated, perfused heart assay, what is predictive of subsequent chronic heart failure and high mortality. Therefore, the results of the present study help to stress the importance of optimal glycemic control in diabetic pregnancy as key to prevent cardiovascular disease in older age in both, mother and offspring.

References

1. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA: **Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1991–2002.
2. Simeoni U, Barker DJ: **Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes.** *Semin Fetal Neonatal Med* 2009, **14**:119–124.
3. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME: **Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease.** *BMJ* 1989, **298**:564–567.
4. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ: **Weight in infancy and death from ischaemic heart disease.** *Lancet* 1989, **2**:577–580.
5. World Health Organization. **Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy.** Geneva, *World Health Org* 2013.
6. **American Diabetes Association Standards of medical care in diabetes - 2010.** *Diabetes Care* 2010, **33**:S11–S16.
7. **American Diabetes Association (2014) Clinical practice recommendations – standards of medical care in diabetes.** *Diabetes Care* 37:S14–S80.
8. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. **International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy.** *Diabetes Care* 2010, **33**(3):676 - 682.
9. Like AA, Rossini AA: **Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus.** *Science* 1976, **193**(4251):415-417.
10. Goldman AS, Baker L, Piddington R, Marx B, Herold R, Egler J: **Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82**(23):8227-8231.
11. Punareewattana K, Holladay SD: **Immunostimulation by complete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, or interferon-gamma reduces severity of diabetic embryopathy in ICR mice.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004, **70**(1):20-27.
12. Ericksson UJ: **The pathogenesis of congenital malformations in diabetic pregnancy.** *Diabetes Metab Rev* 1995, **11**:63-82.
13. Hagay ZJ, Weiss Y, Zusman I, Peled-Kamar M, Reece EA, Eriksson UJ, Groner Y: **Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos.** *Am J Obstet Gynecol* 1995, **173**(4):1036-1041.
14. Gutierrez JC, Hrubec TC, Prater MR, Smith BJ, Freeman LE, Holladay SD: **Aortic and ventricular dilation and myocardial reduction in gestation day 17 ICR mouse fetuses of diabetic mothers.** *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol* 2007, **79**(6):459-464.

15. Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE: **Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats.** *Br J Pharmacol* 2012, **166**(7):2198-2208.
16. Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE: **Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats.** *PLoS One* 2012, **7**(11):e50593.
17. Porto NPC, Jucá DM, Lahlou S, Coelho-de-Souza AN, Duarte GP, Magalhães PJC: **Effects of K⁺ channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010, **118**:360 - 363.
18. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA: **Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring.** *Diabetologia* 1999, **42**:81-89.
19. Agoudemos M, Reinking BE, Koppenhafer SL, Segar JL, Scholz TD: **Programming of adult cardiovascular disease following exposure to late-gestation hyperglycemia.** *Neonatology* 2011, **100**:198–205.
20. Lahlou S, Araujo LPF, Interaminense L, Duarte GP, **Blunted Central Bromocriptine-Induced Tachycardia in Conscious, Malnourished Rats.** *Pharmacol Toxicol* 2003, **92**:189–194.
21. Lahlou S, Lima GC, Leão-Filho CSC, Duarte GP: **Effects of long-term pretreatment with isoproterenol on bromocriptine-induced tachycardia in conscious rats.** *Can J Pharmacol Physiol* 2000, **78**:260–265.
22. Van Bilsen M, Van Den Vusse GJ, Snoeckx LHEH, Arts T, Coumans WA, Willensen PHM, Reneman RS: **Effects of pyruvate on post-ischaemic myocardial recovery at various workloads.** *Pflügers Arch* 1988, **413**:167-173.
23. Sengupta P: **The laboratory rat: Relating its age with human's.** *Int J Prev Med* 2013, **4**:624–630.
24. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA: **Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1991–2002.
25. Silverman BL, Metzger BE, Cho NH, Loeb CA: **Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers: relationship to fetal hyperinsulinism.** *Diabetes Care* 1995, **18**(5):611–617.
26. Hong LZ, Chan YC, Wang MF, Wang JY, Hung SW, Tsai CI, Tseng CJ. **Modulation of baroreflex function by rosiglitazone in prediabetic hyperglycemic rats.** *Physiol Res* 2012, **61**:443–452.
27. Wu JS, Yang YC, Lin TS, Huang YH, Chen JJ, Lu FH, Wu CH, Chang CJ: **Epidemiological evidence of altered cardiac autonomic function in subjects with impaired glucose tolerance but not isolated impaired fasting glucose.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**:3885-3889.

28. Stein PK, Barzilay JI, Domitrovich PP, Chaves PM, Gottdiener JS, Heckbert SR, Kronmal RA: **The relationship of heart rate and heart rate variability to non-diabetic fasting glucose levels and the metabolic syndrome: the Cardiovascular Health Study.** *Diabet Med* 2007, **24**:855-863.
29. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA: **Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring.** *Diabetologia* 1999, **42**:81-89.
30. Anderson EA, Mark AL: **The vasodilator action of insulin: implication for the insulin hypothesis of hypertension.** *Hypertension* 1993, **21**:136-141.
31. Landsberg L: **Hyperinsulinemia: possible role in obesity-induced hypertension.** *Hypertension* 1992, **19**:161-166.
32. Chang CJ, Wu JS, Lu FH, Liu IM, Chi TC, Cheng JT: **Sympathetic hyperactivity in wistar rats with insulin-resistance.** *J Auton Nerv Syst* 1998, **74**:116-119.
33. Rocha SO, Gomes GN, Forti AL, do Carmo Pinho Franco M, Fortes ZB, de Fatima Cavanal M, et al.: **Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring.** *Pediatr Res.* 2005, **58**: 1274-1279.
34. Nehiri T, Duong Van Huyen JP, Viltard M, Fassot C, Heudes D, Freund N, et al.: **Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring.** *Diabetes.* 2008, **57**: 2167-2175.
35. Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang SJ, Katz, A: **Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes.** *J Physiol* 2011, **589**:1791-1801.
36. Thackeray JT, Beanlands RS, Dasilva JN: **Altered sympathetic nervous system signaling in the diabetic heart: emerging targets for molecular imaging.** *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2012, **2(3)**:314-334.
37. Bristow MR: **Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 1993, **22**:61A-71A.
38. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A, Ferrara N: **Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins?** *Front Physiol* 2013, **4**:324.
39. Dalla-Pozza R, Bechtold S, Bonfig W, Putzker S, Kozlik-Feldmann R, Schwarz HP, Netz H: **Impaired short-term blood pressure regulation and autonomic dysbalance in children with type 1 diabetes mellitus.** *Diabetologia* 2007, **50**:2417-2423.
40. Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN and Peterson RG: **Analysis of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) type 2 diabetic rat model suggests a neurotrophic role for insulin/IGF-I in diabetic autonomic neuropathy.** *Am J Pathol* 2003, **163**:21-28.
41. Stevens MJ, Dayanikli F, Raffel DM, Allman KC, Sandford T, Feldman EL, Wieland DM, Corbett J, Schwaiger M: **Scintigraphic assessment of regionalized defects in myocardial sympathetic innervation and blood flow regulation in diabetic patients with autonomic neuropathy.** *J Am Coll Cardiol* 1998, **31**:1575-1584.
42. Maser RE, Mitchell BD, Vinik AI, Freeman R: **The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis.** *Diabetes Care* 2003, **26(6)**:1895-1901.

43. Benfey BG: **Function of myocardial α -adrenoceptors.** *Life Sci* 1982, **31**:101-112.
44. Minneman KP: **α 1-Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} .** *Pharmacol Rev* 1988, **40**:87-119.
45. Demiroren K, Cam L, Oran B, Koc H, Baspinar O, Baysal T, Karaaslan S: **Echocardiographic measurements in infants of diabetic mothers and macrosomic infants of nondiabetic mothers.** *J Perinat Med* 2005, **33**:232–235.
46. Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH: **Diastolic heart failure: abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle.** *N Engl J Med* 2004, **350**:1953-1959.
47. Aurigemma GP, Gottdiener JS, Shemanski L, Gardin J, Kitzman D: **Predictive value of systolic and diastolic function for incident congestive heart failure in the elderly: the Cardiovascular Health Study.** *J Am Coll Cardiol* 2001, **37**:1042-1048.
48. Vasan R, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D: **Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort.** *J Am Coll Cardiol* 1999, **33**:1948-1955.

Figure Legends

Figure 1 – Baroreflex sensibility test in response to increasing bolus doses of sodium nitroprusside in control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) at three different ages (6, 12 and 18 months) (n = 7-8 for each group). Hemodynamic and left ventricular performance were measured simultaneously in conscious rats. Linear regression and average slope of relationship between changes in mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) (A and B, respectively). Linear regression and average slope of relationship between Δ MAP and Δ +dP/dT (C and D, respectively). Linear regression and average slope of relationship between Δ MAP and Δ -dP/dT (E and F, respectively). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. [#]p < 0.05 vs. OC12; *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.01 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni Test).

Figure 2 - Baroreflex sensibility test in response to increasing bolus doses of phenylephrine in control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) at three different ages (6, 12 and 18 months) (n = 7-8 for each group). Hemodynamic and left ventricular performance were measured simultaneously in conscious rats. Linear regression and average slope of relationship between changes in mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) (A and B, respectively). Linear regression and average slope of relationship between Δ MAP and Δ +dP/dT (C and D, respectively). Linear regression and average slope of relationship between Δ MAP and Δ -dP/dT (E and F, respectively). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. ^{##}p < 0.01 vs. OC12; **p < 0.01 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni Test).

Figure 3 - (A) Left ventricle systolic pressure (LVSP) curves obtained at different diastolic pressures (LVDP). (B) Area under curve of LVSP x LVDP in the isolated, perfused heart of control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) at three different ages (6, 12 and 18 months) (n = 7-8 for each group). Values are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure 4 – Maximum percentage increase in left ventricle systolic pressure (LVSP) and heart rate (HR) during infusion of increasing bolus concentrations of isoproterenol in isolated, perfused hearts of control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) with 6 (A and B), 12 (C and B) and 18 (E and F) months of age (n = 7 for each group). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. ^{##}p < 0.01 vs. OC12; *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001 vs. OC18. (Two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni Test).

Tables

Table 1 – Body weight and fasting plasma glucose concentrations in control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) at three different ages.

Age (months)	OC			OD		
	6	12	18	6	12	18
BW (g)	348 ± 5	389 ± 10	428 ± 13	367 ± 10	386 ± 12	417 ± 10
Glycemia (mg/dL)	71 ± 2	85 ± 2	85 ± 1	78 ± 1 [†]	99 ± 3 [#]	103 ± 3 ^{**}
VDW/BW (mg/g)	0.49 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.54 ± 0.01 [†]	0.47 ± 0.01 [#]	0.50 ± 0.02 ^{***}

Values are expressed as mean ± SEM. BW – Body weight; VDW/BW – ventricle dry weight to body weigh.

[†]p < 0.05 and ^{††}p < 0.01 vs. OC6; [#]p < 0.05 and ^{##}p < 0.01 vs. OC12; ^{**}p < 0.01 and ^{***}p < 0.01 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni Test) (n = 6-7 for each group).

Table 2 – Hemodynamic and invasive left ventricular function evaluation in conscious control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) at three different ages.

Age (months)	OC			OD		
	6	12	18	6	12	18
SAP (mmHg)	115 ± 1	123 ± 5	121 ± 3	120 ± 2	143 ± 2 ^{##}	136 ± 1 [*]
DAP (mmHg)	79 ± 1	73 ± 1	80 ± 1	78 ± 3	76 ± 2	89 ± 2 [*]
MAP (mmHg)	90 ± 1	86 ± 3	95 ± 1	92 ± 2	96 ± 1 [#]	107 ± 1 ^{**}
HR (bpm)	313 ± 7	341 ± 11	314 ± 8	332 ± 6	361 ± 26	338 ± 12
LVSP (mmHg)	123 ± 5	139 ± 5	148 ± 2	134 ± 1	148 ± 5	134 ± 2 [*]
LVEDP (mmHg)	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2	4.7 ± 0.2 [†]	4.9 ± 0.2 [#]	6.4 ± 0.4 [*]
+dP/dT (mmHg/ms)	5.9 ± 0.4	7.2 ± 0.5	6.9 ± 0.5	6.2 ± 0.5	7.0 ± 0.7	5.2 ± 0.4 [*]
-dP/dT (mmHg/ms)	-4.6 ± 0.8	-5.1 ± 0.7	-4.0 ± 0.3	-4.7 ± 0.7	-5.3 ± 0.6	-2.8 ± 0.2 [*]
Sympathetic tone (bpm)	40 ± 4	59 ± 3	48 ± 7	45 ± 5	80 ± 4 [#]	87 ± 7 ^{***}
Parasympathetic tone (bpm)	56 ± 8	55 ± 9	49 ± 7	63 ± 9	54 ± 10	51 ± 9
IHR (bpm)	357 ± 3	362.8 ± 7	343 ± 2	343 ± 7	353 ± 5	358 ± 7

Values are expressed as mean ± SEM. SAP - Systolic arterial pressure; DAP -Diastolic arterial pressure; MAP - Mean arterial pressure; HR - Heart rate; LVSP – Left ventricular systolic pressure; LVEDP – Left ventricular end diastolic pressure; ; +dP/dt - rate of left ventricle pressure rise; -dP/dt - rate of left ventricle pressure fall; IHR – Intrinsic heart rate. [†]p < 0.05 vs. OC6; [#]p < 0.05 and ^{##}p < 0.01 vs. OC12; ^{*}p < 0.05 ^{**}p < 0.01 and ^{***}p < 0.001 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni Test) (n = 6-8 for each group).

Table 3 - The baseline measurements of isolated, perfused heart of control offspring (OC) and offspring from diabetic mothers (OD) at three different ages.

Age (months)	OC			OD		
	6	12	18	6	12	18
LVSP (mmHg)	93 ± 3	84 ± 3	88 ± 2	84 ± 4	81 ± 6	78 ± 3 [*]
HR (bpm)	211 ± 15	231 ± 7	148 ± 17	194 ± 13	225 ± 4	132 ± 15
+dP/dT (mmHg/ms)	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1 [*]
-dP/dT (mmHg/ms)	-1.0 ± 0.2	-1.0 ± 0.1	-1.0 ± 0.1	-0.9 ± 0.1	-1.0 ± 0.2	-0.8 ± 0.1 [*]

Values are expressed as mean ± SEM. LVSP – Left ventricular systolic pressure; HR - Heart rate; +dP/dt - rate of left ventricle pressure rise; -dP/dt - rate of left ventricle pressure fall. ^{*}p < 0.05 vs. OC18 (Two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni Test) (n = 6-8 for each group).

Figure 1 - NPS

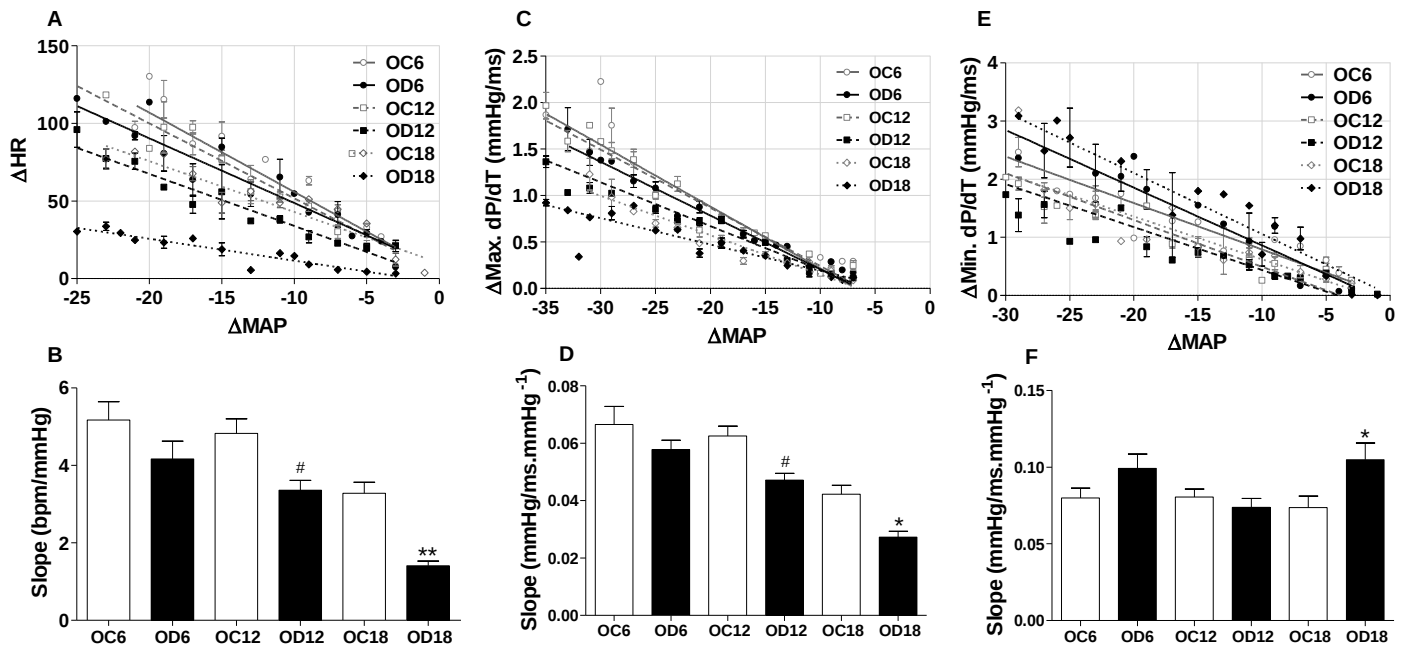


Figure 2 - PHE

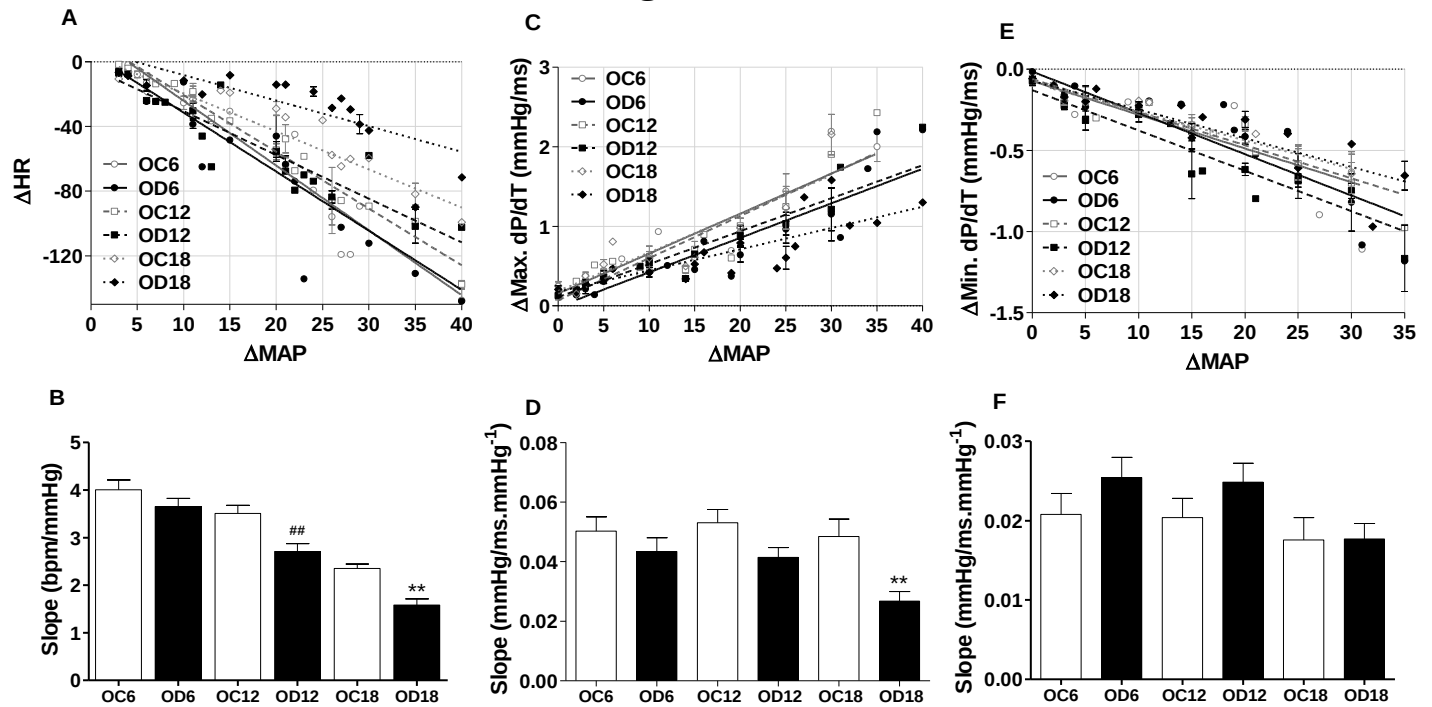


Figure 3

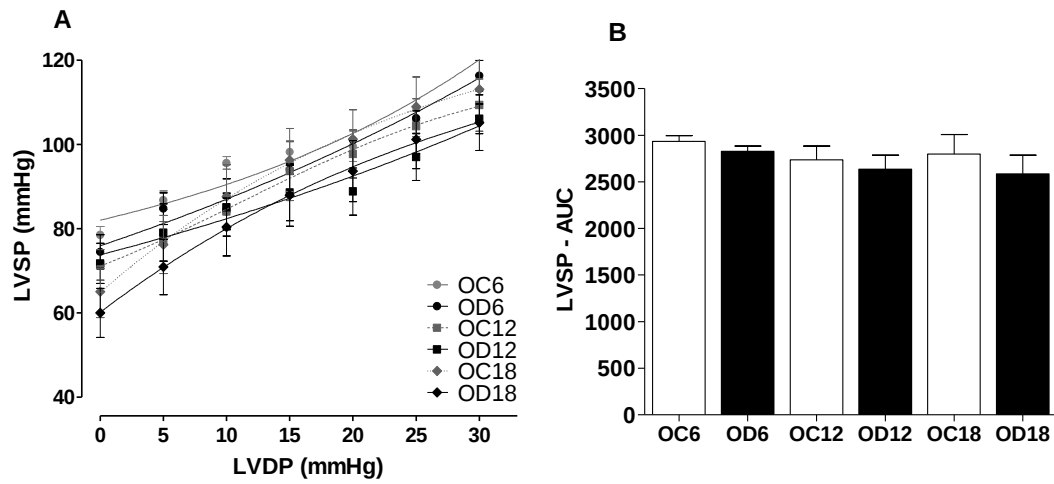
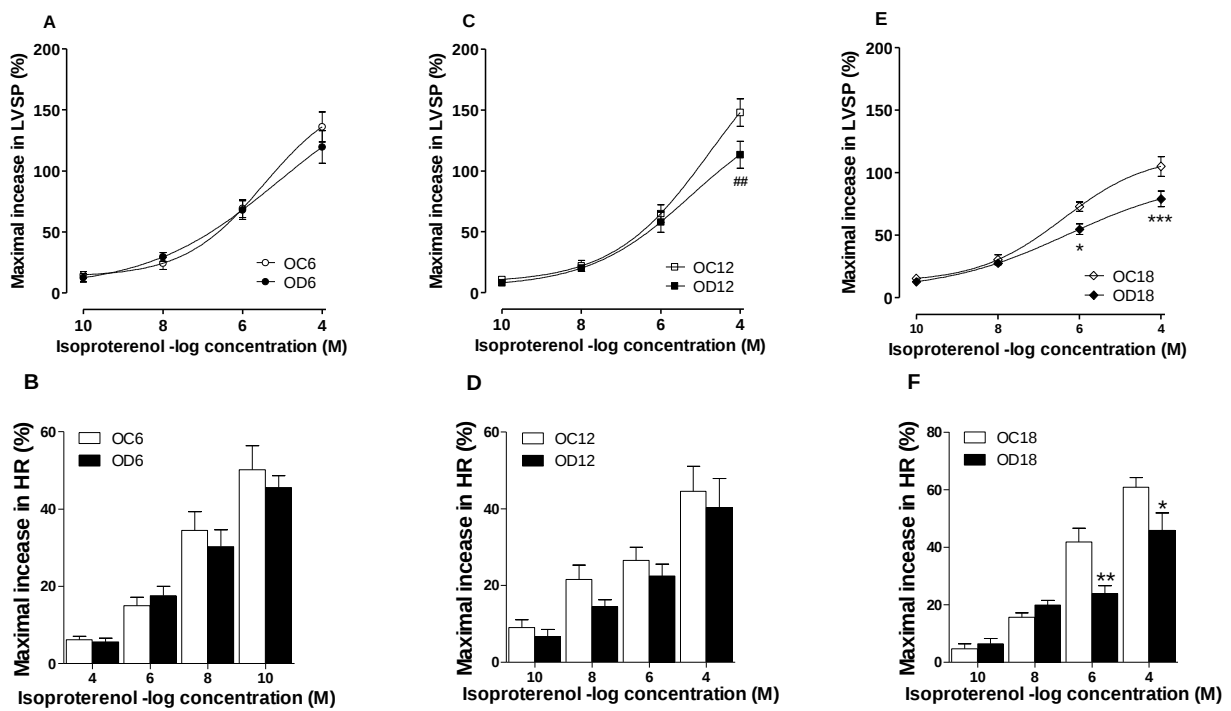


Figure 4



Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a exposição à hiperglicemia materna pode causar distúrbios metabólicos, biométricos e cardiovasculares na prole, os quais tendem a se agravar com o avanço da idade. Esta conclusão geral emerge dos dados apresentados nos dois artigos científicos contidos nesta tese:

- A exposição à hiperglicemia materna resultou em alterações metabólicas em sua prole, as quais se mostraram mais expressivas com o avançar da idade. Contudo, tais alterações ficaram restritas ao metabolismo da glicose.
- Na prole diabética, a condição de baixo peso no nascimento é revertida já após os primeiros meses. Entretanto, existe a tendência para um baixo crescimento e acúmulo de gordura. A composição corporal foi alterada, com percentual de peso maior para o coração e menor para os rins.
- O comprometimento cardiovascular da prole diabética variou consideravelmente entre as idades estudadas e foi mais expressivo na idade de 18 meses, com hipertensão, hipertrofia ventricular, disfunção autonômica, diminuição da sensibilidade à agonistas adrenérgico e redução da função ventricular *in vivo* e *in vitro*, o que é preditivo de insuficiência cardíaca crônica tardia.
- Tais achados são compatíveis com o princípio da programação fetal e predispõem à prole diabética a patologias crônicas potencialmente fatais.