

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL METABÓLICO E INFLAMATÓRIO DA PROLE ADULTA ORIUNDA
DE FÊMEAS EXPOSTAS A HIPERTROFIA CARDÍACA E AO DIABETES**

JOSÉ JAIRO TEIXEIRA DA SILVA

RECIFE, 2017.

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL METABÓLICO E INFLAMATÓRIO DA PROLE ADULTA ORIUNDA
DE FÊMEAS EXPOSTAS A HIPERTROFIA CARDÍACA E AO DIABETES**

JOSÉ JAIRO TEIXEIRA DA SILVA

ORIENTADORA: Dra. GLÓRIA ISOLINA BOENTE PINTO DUARTE

COORIENTADORA: Dra. CRISTINA DE OLIVEIRA SILVA

RECIFE, 2017.

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Silva, José Jairo Teixeira da

Perfil metabólico e inflamatório da prole adulta oriunda de fêmeas expostas a hipertrofia cardíaca e ao diabetes / José Jairo Teixeira da Silva. – Recife: O Autor, 2017.

93 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Coorientadora: Cristina de Oliveira Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2017.

Inclui referências

1. Metabolismo 2. Coração- hipertrofia 3. Diabetes I. Duarte, Glória Isolina Boente Pinto (orient.) II. Silva, Cristina de Oliveira (coorient.) III. Título

572.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-319

JOSÉ JAIRO TEIXEIRA DA SILVA

**PERFIL METABÓLICO E INFLAMATÓRIO DA PROLE ADULTA ORIUNDA
DE FÊMEAS EXPOSTAS A HIPERTROFIA CARDÍACA E AO DIABETES**

Dissertação apresentada para cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovado por:

Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Dra. Valéria Nunes de Souza

Dr. Leúcio Duarte Vieira Filho

Dra. Dayane Aparecida Gomes

Data: **23/12/2015**

DEDICATÓRIA

A minha heroína, **Maria Elza Teixeira de Moura**.

Ao meu alicerce, **Lindalvo Belarmino Bezerra** e **Aline Teixeira da Silva** (*in
memoriam*).

Aos familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

À professora **Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte**, pela maestria ao conduzir esta orientação, por todo o conhecimento e dedicação dispensados e pela contribuição na minha formação pessoal e profissional.

À professora **Dra. Cristina de Oliveira Silva**, pela minha inserção na vida acadêmica, orientação neste estudo, amizade, incentivo e ajuda imprescindível.

Aos professores, **Dr. Fabiano Elias Xavier**, **Dra. Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves**, **Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior** e ao **Dr. Fabio Naro**, pela imprescindível contribuição neste estudo, e coparticipação na minha formação profissional.

Aos **demais professores** que fazem parte do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Bioquímica, pela minha formação acadêmica.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular e do Laboratório de Reatividade Vascular, em especial aos amigos e companheiros de bancada, **Geórgia Maria Ricardo Félix dos Santos** e **Odair Alves da Silva**.

A todos que fazem parte do laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional do Sistema Cardiovascular, Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial aos amigos **Ivson Silva** e **Marina Fevereiro**.

Aos colegas do **Departamento de Fisiologia e Farmacologia**, pela realização de algumas etapas neste estudo.

Aos técnicos de laboratório, **Sr. José Antônio**, **Sra. Dijannah Cota**, **Sr. André Pastor**, e a veterinária **Sra. Cláudia Oliveira**, por todo apoio e colaboração técnica.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia: **Sr. Djalma Silva** pela imensa simpatia e prontidão em ajudar.

Aos **funcionários** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia / Departamento de Bioquímica.

Aos **animais de laboratório**, por possibilitarem associar o conhecimento teórico ao prático, e tornar este estudo possível, expresso meu respeito e sincero agradecimento.

À Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife e Vitória de Santo Antão e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Ao **CNPq, CAPES** pelo auxílio financeiro.

A **todos** que de forma direta e indireta contribuíram para realização deste estudo, meu sincero **obrigado!**

“A maior riqueza do homem é a sua incompletude.

Nesse ponto sou abastado.

Palavras que me aceitam como sou – eu não aceito.

Não aguento ser apenas um sujeito que abre portas,

que puxa válvulas, que olha o relógio,

que compra pão às 6 horas da tarde,

que vai lá fora, que aponta lápis,

que vê a uva etc. etc.

Perdoai

Mas eu preciso ser Outros

Eu penso renovar o homem usando borboletas.”

(Manoel de Barros)

RESUMO

Introdução: Processos patológicos como a hipertrofia cardíaca (HC) e o próprio diabetes (DM) geralmente progridem com prejuízo das defesas antioxidantes e aumento do estresse oxidativo (EO). Não obstante, a compreensão sobre estas doenças durante a gestação e lactação, bem como seus impactos na prole ainda não são claros. **Objetivo:** Avaliar a influência da HC e hiperglicemia materna sobre o perfil metabólico e inflamatório cardíaco da prole adulta. **Metodologia:** Para isto foram desenvolvidos dois protocolos experimentais: i) fêmeas com HC induzida pelo isoproterenol (ISO, 50 mg/Kg); ii) fêmeas com hiperglicemia induzida pela estreptozotocina (STZ, 50 mg/Kg). Ao final da gestação e lactação, foram avaliadas as proles de ratos (n=6-8 animais por grupo experimental) quando adultos. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Institucional, UFPE (Processo nº 23076.006578/2014-03). **Resultados:** A prole adulta exposta a HC materna durante gestação e lactação, apresentou um quadro clássico de intolerância à glicose, bem como aumento da frequência cardíaca (FC), maior área de secção transversal dos cardiomiócitos e maior deposição de colágeno. Por sua vez, a exposição à hiperglicemia materna, impactou na prole alterações biométricas (redução do peso corpóreo, em todas as idades avaliadas) e no perfil lipídico (aumento dos níveis de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), LDL-c e redução nos níveis de HDL. Além disso, induziu disfunção beta-adrenérgica, alterações significantes na FC, bem como incremento do EO, caracterizado por aumento da produção de EROS, nitritos e prejuízo nas defesas antioxidantes. A exposição a hiperglicemia materna resultou em aumento da expressão do RAGE/NOX4 no coração da prole, bem como HC e aumento da deposição de colágeno. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que alterações ocorridas durante o período de gestação e lactação, em decorrência da presença de HC e /ou DM, se reproduzem na prole, precipitando um quadro inflamatório que pode ser a gênese das alterações cardiometabólicas.

Palavras-chave: hipertrofia cardíaca; diabetes gestacional; prole.

ABSTRACT

Introduction: Pathological process such as cardiac hypertrophy and diabetes itself usually are accompanied by impairment of the antioxidants systems and increase of the oxidative stress. On the other hand, comprehension about these diseases during the pregnancy and lactation, as well their impact on adult offspring, remain unclear. **Aim:** To evaluate the influence of the maternal cardiac hypertrophy and maternal hyperglycemia in both, metabolic and cardiac parameters. **Methods:** Two experimental protocols were developed: i) female rats with cardiac hypertrophy induced by ISO, ii) female rats with diabetes induced by STZ. At the end of the gestation and lactation, adult offspring rats of both experimental protocols (n = 6-8 animals per experimental group) were evaluated. All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at UFPE (approval reference number: n° 23076.006578/2014-03). **Results:** The adult offspring exposed to maternal hypertrophy, during gestation and lactation, developed glucose intolerance and pronounced changes in the lipid profile. Besides that, in the same protocol, the offspring showed an increase in the transversal cross-sectional area of cardiomyocytes, as well a higher deposition of collagen. Likewise, maternal hyperglycemia induced impairment of the biometric parameters and of the lipid profile in the second protocol. In addition, contributes to beta-adrenergic dysfunction and heart rate impairment. In the same way, maternal hyperglycemia exposure, results in increased of the oxidative stress, as well upregulation of RAGE/NOX4 pathway in the heart which results in cardiac hypertrophy and increased of collagen levels. **Conclusion:** Our results suggest that alterations during gestation and lactation, due to the presence of cardiac hypertrophy and/or diabetes, reproduce in the offspring, precipitating an inflammatory profile that may be the genesis of cardiometabolic alterations.

Key-words: cardiac hypertrophy; gestational diabetes; offspring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes estímulos induzem diferentes formas de HC **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Ativação dos receptores beta-adrenérgicos medeia toxicidade cardíaca através do EO e ativação de cascatas inflamatórias.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs: produtos finais da glicação avançada;

AMPC: adenosina monofosfato cíclico;

ATP: adenosina trifosfato;

β -AR: receptores β -adrenérgicos;

BPN: baixo peso ao nascer;

CAT: catalase;

CMs: cardiomiócitos;

CMD: cardiomiopatia diabética;

CTFG: fator de crescimento do tecido conectivo;

DCVs: doenças cardiovasculares;

DM: diabetes mellitus;

DM1: diabetes mellitus tipo 1;

DM2: diabetes mellitus tipo 2;

DMG: diabetes mellitus gestacional;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

EO: estresse oxidativo;

EROS: espécies reativas de oxigênio;

ERN: espécies reativas de nitrogênio;

GLUT2- transportador de glicose nas células pancreáticas;

Gs: proteína G estimulatória;

H₂O: molécula de água;

H₂O₂: peróxido de hidrogênio;

HC: hipertrofia cardíaca;

HCC: hipertrofia concêntrica;

HCE: hipertrofia excêntrica;

HVE: hipertrofia ventricular esquerda;

ICAM1: moléculas de adesão de células vasculares 1;

IC: insuficiência cardíaca;

IL-18: interleucina 18;

IL-1 β : interleucina 1 β ;

IL-6: interleucina 6;

IL-1: interleucina 1;

ISO: isoproterenol;

N₂: nitrogênio;

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;

NF- κ B: fator de transcrição nuclear B;

NO: óxido nítrico;

NO₂⁻: nitrito;

NO₃⁻: nitrato;

NOS: óxido nítrico sintase;

O₂: oxigênio;

O₂⁻: ânion superóxido;

OH⁻: radical hidroxila;

ONOO⁻: peróxido de nitrito;

PKA: proteína quinase A;

RAGE: receptor de produtos finais da glicação avançada;

RAP: resposta adaptativa preditiva;

RLs: radicais livres;

SOD: superóxido dismutase;

STZ: estreptozotocina;

TTG: teste de tolerância à glicose;

TRI: teste de resistência à insulina;

TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Programação fetal	18
2.2 Hipertrofia cardíaca	20
2.3 Diabetes	24
2.4 Estresse oxidativo	27
2.5 AGEs-RAGE	30
2.6 NADPH oxidase	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos.....	33
3.2.1 Hipertrofia cardíaca:	33
3.2.2 Hiperglicemia materna:	33
4. REFERÊNCIAS	34
5. ARTIGO I.....	44
6. ARTIGO II	66
7. CONCLUSÃO.....	92

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam um dos maiores problemas de saúde pública, estima-se que no ano de 2030, cerca de 23,3 milhões de mortes no mundo serão registradas devido a essas doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Dentre as complicações cardiovasculares, a hipertrofia cardíaca (HC) constitui um evento em potencial (BERNARDO et al., 2010), sendo associada a diversos processos patológicos, como o próprio diabetes mellitus (DM) (LIU et al., 2012). Não obstante, os mecanismos moleculares envolvidos na HC e/ou DM, durante a gestação e lactação, ainda não são claros.

A HC constitui um mecanismo adaptativo do coração em situações de sobrecarga funcional (BERNARDO et al., 2010). Alterações hemodinâmicas persistentes, cursam com aumento da massa cardíaca, alterações estruturais e funcionais dos cardiomiócitos, bem como fibrose intersticial (GARG; KANNA, 2014). É importante salientar que a cardiomiopatia hipertrófica constitui um risco em potencial durante a gestação (TANAKA et al, 2014). Diversos estímulos contribuem para o processo hipertrófico, como a hipertensão arterial crônica, o infarto agudo do miocárdio, a isquemia associada a distúrbios na artéria coronária, a insuficiência valvular, a miocardite, a cardiomiopatia hipertrófica de origem familiar e a cardiomiopatia diabética (CMD) (LIPDS, 2003; HEINEKE & MOLKENTIN, 2006).

Por sua vez, o DM está implicado em alterações estruturais e funcionais do coração que são independentes da hipertensão, doença da artéria coronária ou de outra patologia cardíaca, o que suporta a existência da CMD, conhecida como uma complicação do diabetes manifestada por disfunção diastólica seguida de anormalidades na função sistólica (WATANABE et al., 2010). A maioria das gestações complicadas pela hiperglicemia são resultantes de um diabetes gestacional (87%) ou pré-gestacional (7,5%) representando um ambiente intrauterino hostil para o desenvolvimento do feto. Quando o diabetes é pré-gestacional ocorre uma elevação nos casos de malformações congênitas que afetam o coração e que conduzem a mortalidade perinatal. (DOWLING et al 2014). Várias evidências epidemiológicas e experimentais sustentam a hipótese que as condições do ambiente uterino interferem no desenvolvimento fetal e isto poderia estar relacionado ao aparecimento de DCVs na idade adulta (BARKER, 1989; WEST, 2010; CAPRA, 2013).

É bem conhecido que, o desenvolvimento de diversos processos patológicos, como a HC (HERMANN et al., 2014) e o DM (DAMASCENO et al., 2013), são acompanhados de redução das defesas antioxidantes e aumento do estresse oxidativo (EO). Reddy e colaboradores (2015), utilizando modelos de infarto do miocárdio, observaram redução dos níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione reduzida, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Não obstante, Moridi et al (2015), em modelos de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ, 60mg/kg), observaram diminuição da atividade antioxidante total em situações de hiperglicemia.

Dentre os modelos experimentais de HC, àqueles que induzem dano cardíaco através da administração do isoproterenol (ISO), um agonista não-seletivo do receptor beta-adrenérgico (GARG; KANNA, 2014), bem como os modelos de indução do diabetes pela STZ, um agente diabetogênico, (DEEDS et al, 2011) constituem alvos em potencial no estudo dos processos de adaptação miocárdica na presença desses agravos. Contudo, são poucos os estudos que relacionam a presença destes distúrbios durante a gestação e lactação, bem como o impacto destes sobre alterações metabólicas e morfológicas na prole adulta.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Programação fetal

Evidências epidemiológicas e experimentais, sustentam a hipótese de que a exposição a um ambiente desfavorável, durante períodos críticos e/ ou sensíveis do desenvolvimento, estaria associada ao aumento do risco de aparecimento de doenças na idade adulta (BARKER, 1998; CAPRA et al., 2013; HANSON; GLUCKMAN, 2015; RAMOS-ALVES et al., 2012; SECO; MATIAS, 2009). Estudos pioneiros como os do Dr. David Barker e colaboradores, com base em ensaios geográficos, sugeriram uma positiva correlação entre más condições nutricionais na gestação e na infância, baixo peso ao nascimento e o aumento da incidência de DCVs em indivíduos adultos (BARKER; OSMOND, 1986; BARKER et al., 1989). Tais observações, contribuíram para formulação da “hipótese de Barker” (BARKER, 1995), posteriormente denominada como “teoria da origem fetal de doenças do adulto” (BARKER, 2007).

Diversos grupos de pesquisa, relacionaram o fator causal “baixo peso ao nascer” (BPN), ao aparecimento de hipertensão arterial (DAVIES et al., 2006), disfunção vascular (LEESON et al., 2001), DM (HALES et al., 1991), resistência à insulina (ERIKSSON et al., 2002; PETTITT; JOVANOVIC, 2007), dislipidemias (DAVIES et al., 2004), alterações renais (TRAN et al., 2008), alterações hepáticas (ERIKSSON et al., 2007), alterações ósseas (SZATHMARI et al., 2000) e distúrbios psiquiátricos (ABEL et al., 2010; THOMPSON et al., 2001). Evidências na literatura, permitem correlacionar a variável peso ao nascimento, como uma resposta de caráter genética, em detrimento da exposição ao ambiente perinatal adverso. Contudo, é importante destacar que a variável BPN não seria apenas um fator preditivo e/ou determinante na gênese de doenças na vida adulta, mas uma resposta frente a estímulos adversos (KARA CALKINS; SHERIN; DEVASCAR, 2011).

Outro conceito difundido na literatura faz referência a “Hipótese do Genótipo Poupador”, a qual refere-se ao fato que, algumas populações poderiam apresentar uma maior predisposição gênica relacionada à resistência à ação da insulina, caracterizando uma resposta adaptativa e benéfica, em ambientes de escassez alimentar (NEEL, 1962). No entanto, é importante salientar que respostas puramente genéticas e que não tem influência do meio, não configuram um correlato biológico verdadeiro (SILVEIRA, et al., 2007).

Ainda nessa perspectiva, uma segunda vertente, denominada de hipótese do fenótipo poupador “the thrifty phenotype hypothesis”, propõe que o feto seria capaz de se adaptar a condições intrauterinas adversas (em termos nutricionais), priorizando órgãos vitais em detrimento de outros órgãos periféricos. Nesse contexto, a resistência insulínica e o diabetes tipo 2, resultariam de uma adaptação fetal poupadora de insulina, em resposta a glicemia materna, como forma de antecipar alterações presentes no ambiente pós-natal (HALES, BARKER, 1992), não obstante, estas alterações não foram explicadas em termos genéticos (GLUCKMAN; HANSON, 2004). Numa extensão dos conceitos até o momento apresentados, estes pesquisadores propuseram a hipótese da Resposta Adaptativa Preditiva (RAP), na qual o feto seria capaz de alterar a atividade celular em detrimento da exposição à determinantes ambientais; por exemplo, em condições adversas, contribuindo para a expressão fenotípica de doenças.

Sendo assim, o conceito da programação fetal inicialmente proposto por Lucas (1991) fundamenta-se na premissa da plasticidade relacionada ao desenvolvimento “developmental plasticity”, com base na Hipótese das Origens Desenvolventistas da Saúde e da Doença “Developmental Origins of Health and Diseases - DOHaD”, na qual um simples genótipo, frente a estímulos aplicados em períodos sensíveis do desenvolvimento, tais como àqueles observados no ambiente intrauterino e/ou perinatal, poderia originar diferentes fenótipos “plasticidade fenotípica”, os quais seriam expressos como alterações tanto a nível celular, no que diz respeito ao número, estrutura, organização e proliferação de células, alterações na acetilação de histonas, na metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), bem como alterações estruturais e/ou funcionais permanentes em diversos órgãos e tecidos (SILVEIRA et al., 2007; HANSON; GLUCKMAN, 2008; HANSON; GLUCKMAN, 2015).

Embora os primeiros estudos enfatizem o aspecto nutricional e tenham como base estudos de coorte populacionais, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos, a fim de elucidar os mecanismos relacionado à gênese das doenças programadas no ambiente intrauterino.

2.2 Hipertrofia cardíaca

A gravidez constitui um risco em potencial para mulheres com HC. É estimado que 0,5-4% das gestações em países desenvolvidos, cursam com doenças do aparelho cardiovascular (REGITZ-ZAGROSEZ et al., 2011). A HC constitui um mecanismo adaptativo do coração, em resposta ao aumento de sua atividade ou sobrecarga funcional (BERNARDO et al., 2010). O processo de adaptação cardíaco pode ocorrer em situações de sobrecarga de pressão e volume, aumento das necessidades metabólicas ou resultante de mecanismos intrínsecos de natureza genética (ex. hipertrofias idiopáticas) (MILL et al., 2001), ocasionando um aumento da massa do miocárdio (ZAK, 1984). A HC pode ser classificada como hipertrofia fisiológica “adaptada” ou patológica “descompensada”. A primeira é resultado de uma alteração hemodinâmica transitória, como por exemplo àquelas observadas no crescimento do coração logo após o nascimento, na gestação e em atletas. Por outro lado, a hipertrofia patológica é decorrente de sobrecargas hemodinâmicas persistentes, como resultado de um quadro hipertensivo, comprometimento valvular, infarto do miocárdio ou cardiomiopatias (MILL, 2001; OLIVEIRA; KRIEGER, 2002; FERNANDES; SOCI; OLIVEIRA, 2011). Desta forma, ambas as classificações cursam com aumento da massa cardíaca, todavia a hipertrofia patológica é tipicamente associada a alterações estruturais e/ou funcionais dos cardiomiócitos (CMs), assim como, da matriz extracelular (LEVY et al., 1990), representando um indicador de grande relevância no risco de morbimortalidade cardiovascular (KANDEL; LEVY; CUPPLES, 1987; NICHTOVA et al., 2012).

A HC fisiológica e patológica pode ser classificada, de acordo com o padrão estrutural cardíaco hipertrófico, em hipertrofia concêntrica (HCC) ou excêntrica (HCE) (Figura 1). A HCC é caracterizada por aumento da massa e espessura das câmaras cardíacas, na ausência ou não de redução da cavidade ventricular, bem como pela adição dos sarcômeros em paralelo e CMs mais espessos. Não obstante, a HCE é caracterizada por aumento da massa e da cavidade ventricular, com adição de sarcômeros em série e neste caso, o comprimento dos CMs se sobressai em relação à espessura (GROSSMAN; JONES, McLAURIN, 1975, apud BERNARDO et al., 2010; PLUIM et al., 2000).

Dentre as DCVs, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é caracterizada por um conjunto de alterações estruturais decorrentes do aumento das dimensões dos CMs (sem divisão celular), da proliferação do tecido conjuntivo intersticial e da rarefação da

microcirculação coronariana (WOLLERT, 2002; WOLLERT; DREXLER, 2002). Durante o crescimento hipertrófico do miocárdio, além das alterações mencionadas anteriormente, ocorrem modificações no padrão de expressão de algumas proteínas contráteis para isoformas do padrão fetal e também a re-expressão de proteínas da programação fetal. A sobrecarga hemodinâmica também induz à re-expressão de genes fetais cardíacos, tais como o peptídeo natriurético atrial e a isoforma da α -actina (SWYNGHEDAUW, 1999).

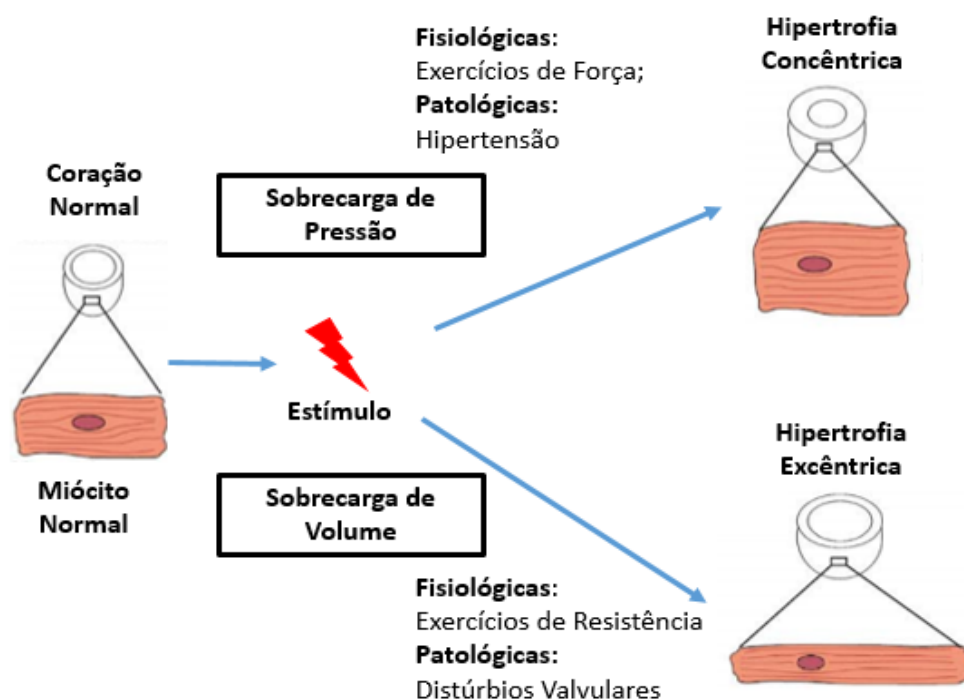


Figura 1. Diferentes estímulos induzem diferentes formas de HC (Adaptado de Bernardo et al., 2010).

Os modelos animais de hipertrofia têm sido amplamente utilizados na indução de hipertrofia patológica. Alguns modelos induzem sobrecarga de pressão (ex. constrição e/ou bandagem da aorta), sobrecarga de volume (shunt da aorta/veia cava) e a utilização de substâncias vasoativas na indução da hipertrofia, como a angiotensina II. Dentre os vários modelos experimentais de HVE os mais utilizados induzem alterações nos níveis pressóricos, provocando uma sobrecarga ventricular (MILL, 2001). Todavia, é possível

induzir HVE através de mecanismos não-pressóricos ou humorais como administração de ISO, um agonista beta-adrenérgico não-seletivo (TAYLOR; TANG, 1984).

Os CMs expressam receptores beta (β -AR) e α_1 -adrenérgicos. A estimulação dos β -AR induz aumento da atividade da proteína G estimulatória (Gs), ativação da adenilato ciclase e subsequente ativação da proteína quinases-A (PKA), e da p38-MAPK (DASH et al., 2003). A estimulação crônica dos β -AR pela administração de ISO, induz aumento da massa cardíaca, alterações na estrutura / função dos CMs, alterações na matriz extracelular, as quais culminam com insuficiência cardíaca (IC) (CAMPOS, 2006). Ademais, a estimulação dos β -AR pelo ISO está associada a uma maior ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (RAJURADAI; PRINCE, 2007), aumento do EO (ZHANG et al., 2005), aumento da expressão de fatores fibrogênicos como o fator de crescimento do tecido conectivo (CTFG) e supra-regulação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) – oxidase (MA et al., 2011). Os modelos experimentais de HVE por ISO induzem alterações na estrutura e função cardíaca, devido ao aumento da resposta inflamatória e prejuízo nas defesas antioxidantes, além da sobrecarga de cálcio. Esses eventos contribuem para apoptose e necrose dos CMs, e consequentemente danos cardíacos (GARG; KANNA, 2014; HERMANN et al., 2014).

Nessa perspectiva (ver Figura 2), o ISO promove aumento da expressão do fator de transcrição nuclear kappa B – (NF-kB), via aumento da expressão de interleucina 18 (IL-18) (CHANDRASEKAR et al., 2004). O ISO também contribui para o aumento do EO, via estimulação do fator de necrose tumoral- alfa (TNF-alfa), IL-1 β e IL-6, através do aumento dos níveis do AMPc, os quais promovem deposição de colágeno e apoptose cardíaca. É importante salientar que a indução da HVE por ISO induz um desequilíbrio fisiológico entre a produção de radicais livres e substâncias antioxidantes (RAJURADAI; PRINCE, 2007). Desta maneira, ocorre disfunção cardíaca, aumento da peroxidação lipídica, alterações nos níveis de marcadores cardíacos e de enzimas antioxidantes (BHIMJI; McNEILL, 1989 apud GOYAL et al. 2010; KUMAR; MENON, 1992; LOH et al. 2007; GARG; KHANNA 2014). Além disso, o ISO promove incremento dos níveis de cálcio ao nível dos CMs, devido a superestimulação dos miofilamentos cardíacos, aumento da força de contração e aumento da degradação do adenosina trifosfato (ATP). Diversos estudos relacionam o aumento dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) com a concentração intracelular de Ca^{2+} (GENG et al., 1999; TOKGÖZOGLU, 2009). Ademais, o acúmulo de sódio (Na^+) intracelular, resultante da redução da atividade

da Na^+/K^+ ATPase, e ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, contribuem para o aumento dos níveis de Ca^{2+} durante a estimulação adrenérgica induzida pelo ISO em cultura de CMs (RAMOS; COMBS; ACOSTA, 1984 apud GARG; KHANNA 2014).

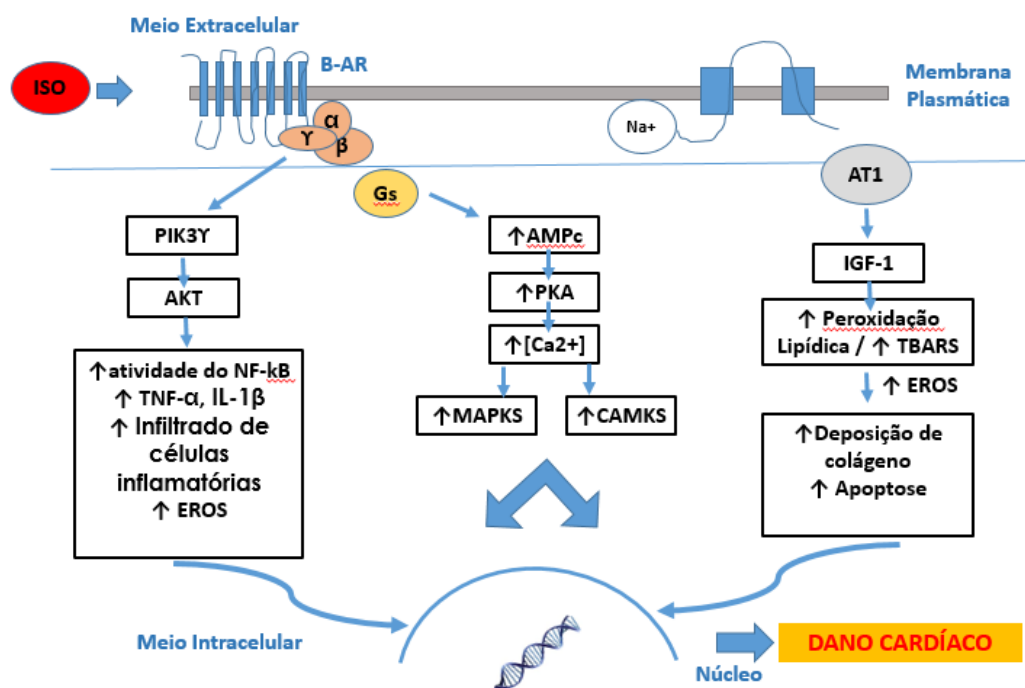


Figura 2. Ativação dos receptores beta-adrenérgicos medeia toxicidade cardíaca através do EO e ativação de cascatas inflamatórias. (Adaptado de, GARG; KANNA, 2014).

Legenda: ISO: isoproterenol; β :AR: receptor beta adrenérgico; PI3K γ : fosfatidil inositol 3 quinase; NF- κ B: fator de transcrição nuclear B; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β : interleucina 1 β ; EROS: espécies reativas de oxigênio; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; PKA: proteína quinase A; MAPKS: proteína quinase dependente de AMPc; CAMKS: proteína quinase dependente de calmodulina; IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; TBARS: substância reativas ao ácidos tiobarbitúrico; AT1: receptor para angiotensina do tipo 1.

Embora os modelos de HC induzidos pelo ISO representem uma importante ferramenta experimental, estudos que correlacionem o processo hipertrófico cardíaco durante a gestação e lactação, e o impacto dessas alterações na prole adulta são poucos. Nesse sentido, investigar os mecanismos relacionados à HC no período perinatal contribuiria para elucidar os mecanismos relacionados à gênese das doenças programadas no ambiente intrauterino.

2.3 Diabetes

O DM caracteriza-se por uma hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, e sua incidência está intimamente relacionada a eventos cardiovasculares em indivíduos diabéticos (JIANG-WHEN et al., 2012). Pacientes com DM apresentam risco aumentado de morbimortalidade cardíaca, independente de outros fatores de risco, tais como hipertensão e distúrbios da artéria coronária (GARCIA-TOUZA; SOWERS, 2012), bem como maior prevalência de cardiomiopatia diabética (CDM) (ACAR et al., 2011; GIANNETA et al., 2012).

A classificação etiológica do DM compreende quatro categorias clínicas: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), Diabetes mellitus gestacional (DMG), bem como outros tipos específicos de DM. O DM1 acomete cerca de 5 a 10% dos pacientes com DM e é proveniente de uma destruição a nível pancreático das células beta das ilhotas de Langerhans, por processos de natureza autoimune ou idiopática, ocasionando deficiência absoluta na produção de insulina. O DM2 é a forma presente em 90–95% dos casos, e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção de insulina (AGUIRE, 2013; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

A definição do DMG proposta pela American Diabetes Association (2015) e pela Internacional Diabetes Federation (2013), definem o DMG como qualquer nível de intolerância a carboidratos, o que leva ao desenvolvimento de um quadro hiperglicêmico cuja gravidade é variável, com início ou diagnóstico durante a gestação e que pode ou não se manter após este período. A prevalência do DMG descrita pelas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009) é de aproximadamente 1-14%, caracterizando este evento como um potencial problema de saúde pública em nosso país. Estima-se que cerca de 15 - 20% das mulheres durante a gestação são acometidas por este distúrbio metabólico e estes valores estão diretamente relacionados com as taxas de morbimortalidade perinatal (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015, DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES; 2009; SIBAI; ROSS, 2010).

Nesse contexto, o DMG representa uma das principais manifestações clínicas durante a gestação. Os valores glicêmicos maternos recebem influência de diversos fatores, tais como o aumento das necessidades fisiológicas, o que impõe ao pâncreas materno, uma maior produção de insulina, a fim de manter os níveis de glicose estáveis e

fornecer aporte de nutrientes ao feto. Os hormônios placentários, tais como o (hormônio lactogênio placentário humano, hormônio do crescimento placentário humano, progesterona e estrogênio), também interferem na utilização da glicose e sensibilidade insulínica. Ademais, a ingesta calórica e adiposidade materna (papel do tecido adiposo como órgão endócrino, aumento dos níveis de TNF-alfa, adiponectina e resistina) contribuem no quadro de resistência à insulina durante a gestação (LAPPAS et al., 2005; SFERRUZZI-PERRI et al., 2011).

A maioria das gestações complicadas por diabetes são resultantes de um diabetes gestacional (87%) ou pré-gestacional (7,5%) representando um ambiente intrauterino hostil para o desenvolvimento do feto. Quando o diabetes é pré-gestacional ocorre uma elevação nos casos de malformações congênitas que afetam o coração e que conduzem a mortalidade perinatal. Entre essas malformações, a cardiomiopatia hipertrófica é comum (DOWLING et al., 2014).

Modelos de diabetes experimental têm sido descritos em uma grande variedade de animais (CHETA, 1998; McNEILL, 1999; REES; ALCOLADO, 2005). Nessa perspectiva, um dos modelos mais utilizados na experimentação animal, são os roedores, em especial os animais da linhagem Wistar. Dentre as características desse modelo, destaca-se a susceptibilidade aos agentes farmacológicos mais utilizados na indução do DM, o curto período de prenhez e a multiparidade. Tais peculiaridades permitem estudar os efeitos do DMG tanto nas fêmeas, quanto no impacto da hiperglicemia nas suas gerações (SZKUDELSKI, 2001).

O DM pode ser induzido experimentalmente por indução cirúrgica (JAWERBAUM; WHITE, 2010), indução farmacológica (DICKINSON et al., 1991; McNEILL, 1999; SZKUDELSKI, 2001), exposição à patógenos (REID, 1981), alterações dietéticas (HEARD; TURNER, 1967; EL AOUI et al, 2007), além da utilização de modelos com alterações genéticas ou espontâneas, animais transgênicos e knock-out (REES; ALCOLADO, 2005). Entretanto, a utilização de agentes farmacológicos como o aloxano e a STZ, constituem um método de fácil obtenção e resultados similares àqueles observados no quadro diabético (SZKUDELSKI, 2001). Contudo, uma das desvantagens da indução química, consiste no fato que os componentes imunológicos e/ou genéticos presentes no DM, encontram-se ausentes (JAWERBAUM; WHITE, 2010; BUGGER; ABEL, 2009).

A STZ é um antibiótico de largo espectro isolado a partir da cepa *Streptomyces achromogenes*. A utilização deste fármaco na clínica é restrita ao carcinoma metastático ao nível das ilhotas pancreáticas. Sua estrutura molecular, 2-deoxi-2(3-(metil-3-nitrosoureido)D)-glicopirranose, destrói seletivamente as células β -pancreáticas, promovendo sua degranulação parcial. Nesse contexto, diversos mecanismos têm sido propostos a fim de elucidar os mecanismos pelo qual a STZ exerce um papel diabetogênico (RAKIETEN; RAKIENTEN; NADKARNI, 1963).

Um dos possíveis mecanismos de ação pelos quais a STZ induz depleção das células β -pancreáticas, poderia ser via GLUT2 (transportador de glicose nas células pancreáticas) e consequente alquilação do DNA e morte destas células (McNEILL, 1999). A não-especificidade deste transportador, foi associada a dano induzido pela STZ em outros tecidos, tais como fígado e rim (IMAEDA et al., 2002; LENZEN, 2008). Outros mecanismos têm sido relacionados à sua ação diabetogênica, como por exemplo o papel da STZ como doador de óxido nítrico, o qual contribuiria para citotoxicidade (IMAEDA et al., 2002), além do aumento do EO por inibição da atividade da superóxido dismutase, permitindo o acúmulo de ânions superóxido e outras espécies reativas de oxigênio às células β (SILVA et al., 2011).

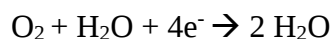
A indução do DMG pela STZ, reproduz efeitos metabólicos maternos e fetais similares aos observados em condições de hiperglicemia durante a gestação. A STZ induz um quadro de hiperglicemia associado à hipoinsulinemia, poliúria, e perda de peso em ratos em gestações acometidas por níveis descompensados de glicemia (DALL AGO et al., 2002; TOMLINSON et al. 1992). Por outro lado, a exposição à um ambiente intrauterino levemente hiperglicêmico está associado a fetos macrossômicos e hipoinsulinêmicos (AERTES; ASSCHE, 1979). Contudo, as comparações dos efeitos do STZ em diferentes modelos animais sofrem influência de diferentes fatores, tais como: dose de escolha, via de administração, preparações, níveis glicêmicos, linhagem, gênero, idade e ciclo circadiano (DEEDS et al., 2011).

Nessa perspectiva, a utilização de modelos de diabetes induzido pela STZ possibilita avaliar o impacto da hiperglicemia materna nos períodos da gestação e lactação, sobre diversos parâmetros da prole em diferentes estágios da vida. Sendo assim, contribui para elucidar os mecanismos relacionados à gênese das doenças programadas no ambiente intrauterino em situações de hiperglicemia.

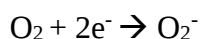
2.4 Estresse oxidativo

O conceito de EO é amplamente definido como um quadro de desequilíbrio redox entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres (RLs), associado à redução/insuficiência das defesas antioxidantes (SIES, 1997; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015), o qual resulta em danos à diversos substratos biológicos, tais como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos ribonucleicos (BIRDEN et al., 2012; CZERSKA et al., 2015; Di MARCO et al., 2015).

O balanço entre a produção de compostos oxidantes e antioxidantes, está associado ao metabolismo celular. Em condições fisiológicas a maior parte do oxigênio (O_2) utilizado no metabolismo aeróbio é reduzido à água (H_2O) pela transferência de 4 elétrons para molécula de O_2 (ver reação abaixo).



Todavia, uma pequena parte do O_2 consumido, é reduzido de forma univalente (ver reação abaixo), dando origem a intermediários altamente instáveis e reativos, denominadas EROS, tais como o ânion superóxido (O_2^-) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).



Além disso, as EROS provêm de diferentes compartimentos celulares, como resultado de diversas reações metabólicas, como àquelas observadas na via das xantinas, das cicloxigenases, das lipoxigenases, das mieloperoxidases, do citocromo p450 monooxigenase, do óxido nítrico sintase (NOS), das peroxidases e da via da NADPH oxidase. Os compostos oxidantes fazem parte do produto normal do metabolismo celular, contudo encontram-se elevados em condições patológicas (GRIENDLING; FITZGERALD, 2003; BIRDEN et al, 2012; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

Dentre as EROS, merecem destaque os componentes radicais, tais como o ânion O_2^- , o radical hidroxila ($OH^\cdot$), bem como compostos não-radicais como o peróxido hidrogênio (H_2O_2). De maneira similar àquelas observada no metabolismo aeróbico do O_2 , moléculas de nitrogênio (N_2) podem ser reduzidas à compostos altamente reativos, denominados de espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico (NO), o

peróxido de nitrito (ONOO^-), os nitritos (NO_2^-) e os nitratos (NO_3^-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Por sua vez, os sistemas de defesa antioxidantes (enzimáticos e não-enzimáticos), exercem seus efeitos através da inibição e/ou redução dos danos induzido pelos RLs, bem como pelas moléculas não-radicais. Os principais antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Por outro lado, os antioxidantes não-enzimáticos necessitam ser adquiridos de maneira exógena, ou seja, através de uma alimentação/suplementação apropriada (BIRDEN et al., 2012; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

É bem conhecido que, o desenvolvimento de diversos processos patológicos, como a HC (HERMANN et al., 2014) e o DM (DAMASCENO et al., 2013; KOKA et al., 2013; 2014), são acompanhados pela redução das defesas antioxidantes e aumento do EO. Moridi e colaboradores (2015) utilizando modelos de diabetes induzido por STZ, observaram diminuição da atividade antioxidante total. Ademais, estudos como o de GONCHAROV (2015) enfatizam o papel das EROS e das ERN na gênese de condições clínicas como a aterosclerose.

O EO e a apoptose cardíaca, foram descritos como causas de alterações cardiovasculares induzidas pelo DM (SHIRPOOR et al., 2009), uma vez que o aumento da produção de RLs tem sido atribuído às complicações diabéticas, em diversos modelos de experimentação animal (PENCKOFER; SCHWERTZ; FLORAZAK, 2002). Não obstante, a NADPH oxidase 4 (NOX4) tem sido descrita como um dos principais mediadores do EO na insuficiência cardíaca (KURODA et al., 2010).

Diversos estímulos estariam envolvidos na produção de citocinas inflamatórias, dentre essas, merece destaque o fator de transcrição nuclear kappa – B (NF- κ B), pois sua ativação resulta na produção de proteínas pró-inflamatórias, EROS/ERN, fatores de crescimento (SPRAGUE; KHALIL, 2009). O NF- κ B tem sido descrito como modulador de diversos genes envolvidos em processos inflamatórios, na resposta autoimune, na produção de fatores de crescimento e fatores de desenvolvimento celular. Além disso, o NF- κ B pode ser ativado por uma grande diversidade de sinais, como: citocinas, patógenos, injúrias e outras situações relacionados ao estresse. Atualmente, investigações

sugerem a participação deste fator de transcrição de mediadores inflamatórios na maioria dos tipos celulares (NAPETSCHING; WU, 2013).

Evidências experimentais, correlacionam o papel do TNF-alfa ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como a importância da via de sinalização do NF- κ B na resposta inflamatória (AL-RASHEED et al., 2015; GULLESTAD et al., 2012; SRIRAMULA; FRANCIS, 2015). O TNF-alfa, é uma citocina relacionada a diversos processos biológicos, o aumento deste está intimamente relacionado a gênese de DCVs, tais como a hipertensão (SRIRAMULA; HAQUE; MAJID, 2008; ZHANG et al., 2006). Estudos relacionam o papel do TNF- α na hipertrofia e remodelamento cardíaco. Vale ressaltar, que a ativação de NF- κ B modula a expressão gênica de TNF- alfa no coração (YEH et al., 2009) e em cultura de CMs (MAASS et al., 2002). O TNF-alfa possui um papel central em diversas cascatas inflamatórias, contribuindo para o aumento dos níveis de IL-1 e IL-6 e dos níveis de EROS (ZHANG et al., 2006). Sua produção faz parte da resposta imune inata diante de diversos estímulos nocivos, portanto, encontra-se elevada em condições clínicas como na aterosclerose, no infarto agudo do miocárdio e na insuficiência cardíaca (FRANTZ; BAUERSACHS; KELLY, 2005). Desta forma, a estimulação do TNF-alfa induz aumento da atividade da quinase do I κ B (IKK), fosforilação e subsequente degradação de I κ B e translocação do NF- κ B para o núcleo (NAPETSCHING; WU, 2013). Conforme descrito anteriormente, a ativação do NF- κ B, induz aumento da produção de citocinas inflamatórias, da produção de fatores de crescimento e do EO (AL-RASHEED et al., 2015; LEYCHENCO et al., 2009).

No caso do DM, a ativação do complexo NF- κ B, contribui com maior expressão gênica das moléculas envolvidas no processo inflamatório (LORENZO et al., 2011). Estudos mais recentes indicam que uma interação entre NF- κ B e TNF-alfa, induz ativação de IKK- β a qual amplificaria o EO contribuindo para disfunção endotelial no DM-2 (YANG et al., 2009). Foi demonstrado que em pacientes com DM1 com glicemia mal controlada, uma maior ativação do NF- κ B em monócitos e uma correlação positiva entre essa ativação e o EO (HOFFMANN et al., 1998). Já em pacientes com DM-2, além da maior ativação do NF- κ B ocorre diminuição dos níveis de GPx intracelular (ARNALICH et al., 2001). Mariappan e colaboradores (2010), observaram em camundongos db/db,

depressão da função sistólica, associado ao aumento dos níveis de NF- κ B, de TNF-alfa e IL-6, e subsequente aumento do EO.

Como anteriormente mencionado, diversos processos fisiopatológicos contribuem para o dano cardíaco, associados ou não ao DM, pela ativação da cascata de sinalização do NF- κ B. Possui papel de destaque no acometimento cardíaco os produtos finais da glicação avançada (AGEs) através de seu receptor (RAGE) (ZHAO, RANDIVE, STEWART, 2014).

2.5 AGEs-RAGE

Os AGEs são compostos gerados sob condições de hiperglicemia, aumento do EO e hipóxia tecidual (PIPERI et al., 2012; YAN, RAMASAMY, SCHMIDT, 2008) e tem como representantes, uma grande variedade de substâncias formadas a partir de interações do tipo amino-carbonilas, de natureza não enzimática, com açúcares redutores, lipídios, proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER; SELL; GENUTH, 2005). É relatado na literatura, uma grande variedade de ligantes relacionados aos AGEs, dentre eles o seu receptor (RAGE) é provavelmente uma das moléculas mais bem caracterizadas. Estudos como o de Méndez (2003), relacionam o papel do NF- κ B e IL-6, ao gene promotor da expressão de RAGE, os quais controlam sua atividade, associando o RAGE ao evento inflamatório.

A interação AGEs/RAGE tem sido relacionada a disfunção cardíaca em pacientes diabéticos, de maneira similar àquela observada no comprometimento vascular (YAMAGISHI et al., 2012), contudo os mecanismos que envolvem o acúmulo de AGEs e a insuficiência cardíaca ainda não estão totalmente esclarecidos (CAO et al., 2015). Acredita-se que os AGEs atuem por duas vias distintas, induzindo danos diretos às proteínas presentes na matriz extracelular ou através de interações com o seu receptor - RAGE. (HARTOG et al., 2007). Não obstante, o aumento da atividade do complexo AGEs/RAGE a nível das células endoteliais, células musculares lisas e monócitos, induz aumento da produção de substâncias vasocontráteis, aumento da inflamação e de fatores de crescimento teciduais, além de contribuir para disfunção coronariana, aterosclerose e trombose (CAO et al., 2015).

Em condições fisiológicas os níveis de expressão tecidual de RAGE encontram-se reduzidos, contudo em condições patológicas, como na insuficiência cardíaca e no DM, foi observado aumento da atividade deste receptor (GOLDIN et al., 2006). Ma e

colaboradores (2009), estudaram o impacto do DM induzido por STZ sob parâmetros cardíacos. Neste modelo, a hiperglicemia induziu aumento da expressão proteica cardíaca de RAGE, bem como prejuízo na resposta contrátil. Por outro lado, o impacto na contratilidade cardíaca foi prevenido em animais knockout para RAGE. Além disso, evidências experimentais, como àquelas observadas por Nielsen e colaboradores (2009), ao bloquear RAGE no coração de camundongos diabéticos, observaram melhora da função cardíaca diastólica, bem como redução dos níveis de colágeno. O aumento da sinalização via AGEs/RAGE foi associado ao aumento da expressão de proteínas da matriz extracelular e subsequente aumento da produção de diversos tipos de colágeno (ZHAO, RANDIVE, STEWART, 2014). Proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e a elastina, são alvos biológicos de grande relevância, devido a sua alta sensibilidade aos níveis elevados de AGEs (GOH; COOPER, 2008).

Dados recentes sugerem uma possível interação entre RAGE e NADPH oxidase na gênese das complicações micro e macrovasculares em condições de hiperglicemia (KOULIS et al., 2015). Nesse contexto, estudos que referenciam a participação destas vias (RAGE/NOX) em eventos cardiovasculares da prole exposta a condições perinatais desfavoráveis, ainda permanecem escassos.

2.6 NADPH oxidase

A NADPH oxidase é um dos principais mediadores do EO cardíaco. A atividade deste complexo tem sido descrita em cardiomiócitos, células endoteliais, músculo liso e fibroblastos (Selemides et al., 2008), além de se encontrar elevada em diversos condições clínicas, como na progressão da HC e subsequente IC (Li et al., 2002), bem como no DM (Huynh et al., 2013). Ademais, o complexo NADPH oxidase à nível cardíaco, contribui com a maior produção de EROS à nível mitocondrial (via cadeia transportadora de elétrons), bem como, através da via do NOS, quando desacoplada (SUGAMURA; KEANEY, 2011).

Dentre as subunidades do complexo NADPH oxidase, a NOX4 tem sido descrita na literatura, como o principal mediador do EO na IC. Ademais, o aumento da expressão da NOX4 no tecido cardíaco contribui para o aumento da produção de O_2^- e sua rápida conversão em H_2O_2 . (KURODA et al., 2010). Estudos como o de Ago e colaboradores (2014), frente à estímulos hipertróficos, observaram aumento da expressão de NOX4, o qual contribuiu para disfunção mitocondrial e apoptose em cardiomiócitos. Além disso,

o aumento da expressão de NOX4 em fibroblastos cardíacos, tem sido associado a fibrose cardíaca (CUCORANO et al., 2005).

Nesta perspectiva, estudos que referenciam o impacto do DM e HC sobre os níveis de NOX4 cardíaco no coração da prole em diferentes estágios da vida são poucos. Sendo assim, este estudo contribui para a melhor compreensão acerca dos mecanismos relacionados à gênese das doenças programadas no ambiente intrauterino.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a influência da hipertrofia cardíaca e hiperglicemia materna sobre o perfil metabólico e inflamatório cardíaco da prole adulta.

3.2 Específicos

3.2.1 Hipertrofia cardíaca:

- i. Validar o modelo de hipertrofia cardíaca materna;
- ii. Determinar os parâmetros biométricos da prole ao nascimento, aos 3 e 6 meses de idade;
- iii. Determinar as taxas plasmáticas de glicose, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e HDL;
- iv. Realizar teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de resistência à insulina (TRI);
- v. Determinar os níveis cardíacos de EROS, nitritos, bem como a atividade da SOD e catalase;

3.2.2 Hiperglicemia materna:

- i. Validar o modelo de hiperglicemia materna;
- ii. Determinar os parâmetros biométricos da prole ao nascimento, aos 3 e 6 meses de idade;
- iii. Avaliar os níveis glicêmicos e lipídicos da prole aos 3 e 6 meses de idade;
- iv. Medida direta da pressão arterial aos 6 meses;
- v. Avaliar a função cardíaca 'ex vivo' através da técnica de Langendorff;
- vi. Avaliar os níveis cardíacos de EROS, Nitritos, SOD, CAT e glutathionas;
- vii. Mensurar a expressão proteica de RAGE e NOX 4 no coração da prole;
- viii. Avaliação microscópica e histomorfométrica do coração da prole adulta;
- ix. Analisar os níveis de colágeno cardíaco.

4. REFERÊNCIAS

- ABEL, K.M. et al. Birth weight, schizophrenia, and adult mental disorder: is risk confined to the smallest babies? **Arch Gen Psychiatry**, v.67, n.9, p.923-930, 2010.
- ACAR, E. et al. Diabetic cardiomyopathy, **Anadolu Kardiyol.**, v.11, p.732-737, 2011.
- AERTES, L.; ASSCHE, F.A.V. Is gestacional diabetes an acquired conditions? **J.Devel. Biol**, v.1, p.219-225, 1979.
- AGUIREE, F. et al. **IDF Diabetes Atlas**. 2013.
- AL-RASHEED, N.M.; et al. Vitamin D attenuates pro-inflammatory TNF- α cytokine expression by inhibiting NF- κ B/p65 signaling in hypertrophied rat hearts. **J Physiol Biochem.**, v.71, p.289-299, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **STANDARS OF MEDICAL CARE IN DIABETES** – 2015.
- ARNALICH, F.; et al. Intracellular glutathione deficiency is associated with enhanced nuclear factor-kappaB activation in older non-insulin dependent diabetic patients. **Free Radic Res.**, v.35, n.6, p.873-84, 2001.
- BARKER, D.J.P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v.1, n.8489, p.1077-1081, 1986.
- BARKER, D.J.P. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **Br Med J**, v. 298, p.564-567, 1989.
- BARKER, D.J.P. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v.311, n.6998, p.171-174, 1995.
- BARKER, D.J.P. In utero programmig of chronic disease. **Clinical Science**, v.95, p.115-28, 1998.
- BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v.261, p.412-417, 2007.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidative: relação entre espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, v. 128, n. 1, p. 191–227, 2010.
- BHIMJI, B.; McNEILL, J.H. Isoproterenol-induced ultrastructural alterations in hearts of alloxan-diabetic rabbits. **Gen. Pharmacol.**, v.20, P.479–485, 1989.
- BIRDEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **WAO**, p.9-19, 2012.

BUGGER, H.; ABEL, E.D. Rodent models of cardiac cardiomyopathy. **Dis model Mech.**, v.2, n.9-10, p.454-466, 2009.

CAMPOS, L.A. et al. Enhanced isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.291, n.5, p.2371-6, 2006.

CAPRA, L. et al. The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation. **Journal of Pediatrics**, v.39, n.7, p.1-12, 2013.

CAO, W. et al. Advanced end products induced immune maturation of dendritic cells controls heart failure through NF- κ B signaling pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v.580, p.112-120, 2015.

CHANDRASEKAR, B. et al. Beta-adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via beta2-AR, PI3K, IKK, and NF-kappaB. **Biochem Biophys Res Commun**, v.319, p.304-311, 2004.

CHETA, D. Animal models of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **J Pediatr Endocrinol Metab.**, v.11, n.1, p.11-19, 1998.

CZERSKA, M. et al. Today's oxidative stress markers. **Medycyna Pracy**, v.66, n.3, p.393-405, 2015.

DALL'AGO P.; et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res.**, v.35, p. 843–849, 2002.

DAMASCENO, D.C.; et al. Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions, **Journal of Diabetes Research**, 2013.

DAVIES, A.A. et al. Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. **Circulation**, v.110, p.1258-1262, 2004.

DAVIES, A.A. et al. Association Between Birth Weight and Blood Pressure Is Robust, Amplifies With Age, and May Be Underestimated. **Hypertension**, v.48, p.431-436, 2006.

DASH, R. et al. Differential regulation of p38 mitogen activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. **Cardiovasc Res.**, v.57, p.704-14, 2003.

DEEDS, M.C. et al. Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. **Lab Anim.**, v.45, n.3, p.131-140, 2011.

DICKINSON, J.E. et al. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in the pregnant ewe. **Am J Obstet Gynecol**, v.165, p.1673-1677, 1991.

DI MARCO, E. et al. Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? **Clinical Science**, v.129, p.199-216, 2015.

DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2009 / Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diabetes mellitus gestacional: diagnóstico, tratamento e acompanhamento pós-gestacional**. 3. ed. – A. Araújo Silva Farmacêutica, 144-149, 2009.

DOWLING, D. et al. Cardiomyopathy in Offspring of Pregestational Diabetic Mouse Pregnancy. **Journal of Diabetes Research**, v.14, 2014.

EL AOUI, S. et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovascular Diabetology**, v.5, p.4, 2007.

ERIKSSON, J.G. et al. The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on insulin sensitivity and insulin metabolism interact with size at birth. **Diabetes**, v.51, p.2321-2324, 2002.

ERIKSSON, J.G. et al. Childhood growth and hypertension in later life. **Hypertension**, v.49, n.6, p.1415-1421, 2007.

FERNANDES, T.; SOCI, U.P.; OLIVEIRA, E.M. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. **Braz J Med Biol Res**, v.44, n.8, p.836-847, 2011.

FRANTZ, S.; BAUERSACHS, J.; KELLY, R.A. Innate immunity and the heart. **Curr Pharm Des**, v.11, p.1279-1290, 2005.

GARCIA-TOUZA, M.; SOWERS, J.R. Evidence-based hypertension treatment in patients with diabetes. **J. Clin. Hypertens**, v.14, p.97-102, 2012.

GARG, M.; KHANNA, D. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, 2014.

GENG, Y. et al. Apoptosis of cardiac myocytes in Gs alpha transgenic mice. **Circ Res**, v.84, p.34-42, 1999.

GIANNETTA, E. et al. Chronic inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. **Circulation**, v.125, p.2323-2333, 2012.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Developmental Origins of Disease Paradigm: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. **Pediatr Res**, v.56, p.311-317, 2004.

GOLDIN, A.; et al. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v.114, n.6, p.597-605, 2006.

GONCHAROV, N.V. et al. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis. **Curr. Pharm. Des.**, v.21, p.1134-1146, 2015.

GOYAL, et al. Modulation of PPAR-by telmisartan protects the heart against myocardial infarction in experimental diabetes. **Chemico-Biological Interactions.**, v.185, p.271–280, 2010.

GOH, S.Y.; COOPER, M.E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.93, n.4, p.1143-1152, 2008.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury part 1: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v.108, p.1912-1916, 2003.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; McLAURIN, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest**, v.56, n.1, p.56-64, 1975.

GULLESTAD, L.; et al. Inflammatory Cytokines in Heart Failure: Mediators and Markers. **Cardiology**, v.122, p.23-35, 2012.

HALES, C.N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, v.303, n.6809, p.1019-1022, 1991.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v.35, n.7, p.595-601, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Developmental Origins of Health and Disease: New Insights. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.102, p. 90-93, 2008.

HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Developmental Origins of Health and Disease - Global public health implications. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.29, p.24-31, 2015.

HARTOG, J.W.; et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. **Eur. J. Heart Fail.**, v.9, p.1146-1155, 2007.

HEARD, C.R.; TURNER, M.R. Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. **Diabetes**, v.16, p.96-107, 1967.

HERMANN, et al. Isoproterenol effects evaluated in heart slices of human and rat in comparison to rat heart in vivo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.274, p.302-312, 2014.

HOFFMAN, J.C.; et al. Human B cell differentiation: dependence on interactions with monocytes and T lymphocytes via CD40, CD80 (B7.1), and the CD2-Ligands CD48 and CD58 (LFA-3). **Cell Biol Int.**, v.22, n.1, p.21-9, 1998.

HUYUNG K., et al. Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. **Free Radic Biol Med**, v.60, p.307-317, 2013.

IMAEDA, A.; et al. DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. **Food Chem Toxicol**, v.40, n.7, p.979-987, 2002.

JAWERBAUM, A.; WHITE, V. Animal models in diabetes and pregnancy. **Endocrine Reviews**, v.31, n.5, p.680-701, 2010.

JIANG-WHEN, L. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic cardiomyopathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.427, p.441-443, 2012.

KANNEL, W.B.; LEVY, D.; CUPPLES, L.A. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham study. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.10, 1987.

KARA CALKINS, M.D.; SHERIN U. DEVASKAR, M.D. Fetal Origins of Adult Disease. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v.41, p.158-176, 2011.

KOULIS, C. et al. Linking RAGE and Nox in diabetic micro- and macrovascular complications. *Diabetes & Metabolism.*, v.41, p.272-81, 2015.

KOKA, S. et al. Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice. **Free Radic Biol Med.**, v.60, p.80–88, 2013

KOKA, S. et al. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 with tadalafil attenuates mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic hearts: potential role of NO/SIRT1/PGC-1 α signaling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.306, 2014.

KUMAR, J.S.; MENON, V.P. Changes in levels of lipid peroxides and activity of superoxide dismutase and catalase in diabetes associated with myocardial infarction, **Indian J. Exp. Biol.**, v.30 p.122–127, 1992.

KURODA, J. et al. NADPH oxidase 4 (NOX4) is a major source of oxidative stress in failing heart. **PNAS**, v.107, n.35, p.15565-15570, 2010.

LAPPAS, M. et al. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus complicated pregnancies. **J Endocrinology**, v.186, p.457-465, 2005.

LEESON, C.P.M. et al. Impact of Low Birth Weight and Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Function in Early Adult. **Circulation**, v.103, p.1264-1268, 2001.

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

LEVY, D. et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med**, v.322, n.22, p.1561-1566, 1990.

LEYCHENCO, A.; et al. Stretch induced hypertrophy activates NF- κ B-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes. **PLoS One**, v.6, n.12, 2011.

LI, J.M., et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophic to failure. **Hypertension**, v.40, n.4, p.477-484, 2002.

LIU, J.W. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic cardiomyopathy. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.427, p.441-443, 2012.

LOH, K.H. et al. Effects of thalidomide on isoprenaline-induced acute myocardial injury: a haemodynamic, histopathological and ultrastructural study. **Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.**, v.100, p.233–239, 2007.

LORENZO, O. et al. Potential role of nuclear factor κ B in diabetic cardiomyopathy. **Mediators of inflammation**, 2011.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. CIBA Found. **Symp.**, v.158, p.38-50, 1991.

MA, H. et al. Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) up-regulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy. **J Cell Mol Med.**, v.13, n.8B, p.1751-1764, 2009.

MA, X. et al. Distinct actions of intermittent and sustained B-adrenergic receptor stimulation on cardiac remodeling. **Sci. China Life Sci.**, v.54, p.493-501, 2011.

MAASS, D.L.; et al. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burnrelated cardiac contractile dysfunction. **Shock**, v.17, p.293-299, 2002.

MARIAPPAN, N. et al. NF-kB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. **Cardiovascular Research.**, v.85, p.473-483, 2010.

MÉNDEZ, J.D. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. **Gac Méx Méx**, v.139, p.1, 2003.

McNEIL, J.H. Experimental models of diabetes. **CRC Press LLC**, 1999.

MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. Cardiac hypertrophy. **Rev Bras Hipertension.**, v.8, p. 63-75, 2001.

MONNIER, V.M.; SELL, D.R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Ann NY Acad Sci**, v.1043, p.567-581, 2005.

MORIDI, H. et al. Resveratrol-Dependent Down-regulation of Receptor for Advanced Glycation End-products and Oxidative Stress in Kidney of Rats With Diabetes. **Int J Endocrinol Metab.**, v.13, n.2, 2015.

NAPETSCHING, J.; WU, H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. **Annu Rev Biophys.**, v.42, p. 443-68, 2013.

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

NICHTOVA, Z. et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. **Gen Physiol Biophys**, v31, p.141-151, 2012.

NIELSEN, J.M. et al. Blockage of receptor for advanced glycation end products prevents development of cardiac dysfunction in db/db type 2 diabetic mice. **Eur J Heart Fail.**, v.11, p.638-647, 2009.

OLIVEIRA, E.M.; KRIEGER, J.E. HC e treinamento físico: Aspectos moleculares. **Hipertensão**, v.5, p.73-78, 2002.

PENCKOFER, S.; SCHWERTZ, D.; FLORCZAK, K. Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants, **J. Cardiovasc. Nurs.**, v.6, p.68–85, 2002.

PETTITT, D.J.; JOVANOVIĆ, L. Low birth weight as a risk factor for gestational diabetes, diabetes, and impaired glucose tolerance during pregnancy. **Diabetes Care**, v.30, s.2, p.147-149, 2007.

PIPERI, C.; et al. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.97, n.7, p.2231-2242, 2012.

PLUIM, B.M. et al. The athlete’s heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. **Circulation**, v.101, n.3, p.366-344, 2000.

RAJURADAI, M.; PRINCE, P.S. Prevention effect of narginin on cardiac mitochondrial enzymes during isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: a transmission electron microscopic study. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v.21, p.354-61, 2007.

RAMOS-ALVES, F.E. et al. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, v.166, p.2190-2208, 2012.

RAMOS, K.; COMBS, A.; ACOSTA, D. Role of calcium in isoproterenol cytotoxicity to cultured myocardial cells. **Biochem Pharmacol**, v.33, p.1989-1992, 1984.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L. NADKARNI, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemothe Rep**, v.29, p.91-98-1963.

REDDY, M.A.; ZHANG, E.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. **Diabetol.**, v.58, n.3, p.443-455, 2015.

REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabt Med.**, v.22, n.4, p.359-370, 2005.

REGITZ-ZAGROSEK, V. et al. ESC guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy: The Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J.**, v.32, n.24, p.3147-3197, 2011.

REID, P.M. Animals models of diabetes mellitus: a review. **Lab. Animals**, v.26, p.40-45, 1981.

REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabt Med.**, v.22, n.4, p.359-370, 2005.

SECO, S.; MATIAS, A. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de Barker. **Acta Obstet ginecol**, v.3, n.3, p.158-168, 2009.

SELEMIDES, S., et al. NADPH oxidase in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacol Ther**, v.120, n.3, p.254-291, 2008.

SFERRUZI-PERRI, A.N., et al. Placental-specific Igf2 deficiency alters developmental adaptations to undernutrition in mice. **Endocrinology**, 2011.

SHIRPOOR, A. et al. Cardioprotective effect of vitamin E: rescues of diabetes -induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat. **J Diabetes Complications.**, v.23, n.5, p.310-316, 2009.

SIBAI, B.M.; ROSS, M.G. Hypertension in gestacional diabetes mellitus: phatophysiology and long-term consequences. **J. Maternal. Fetal Neonatal Med.**, Peruja, v.23, p.229-233, 2010.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v.82,n.2,p.291-295, 1997.

SILVA, A.M.O. et al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o EO em ratos diabéticos. **Rev. Nutr.**, v.24, n.1, p.121-130, 2011.

SILVEIRA, P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J.Pediatric**, v.83, n.6, p.494-504, 2007.

SITI, H.N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, 2015.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v.78, p.539-552, 2009.

SRIRAMULA, S.; FRANCIS, J. Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress. **PLoS One**, v.10, n.9, 2015.

SRIRAMULA, S.; HAQUE, M.; MAJID, D.S. Involvement of tumor necrosis factor- α in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v.51, p.1345-1351, 2008.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J.F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radic Biol Med**, v.51, n.5, p.978-992, 2011.

SZATHMARI, M. et al. Higher osteocalcin level and cross-links excretion in young men born with low birth weight. **Calcif Tissue Int.**, v.67, p.429-433, 2007.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.**, v.50, n.6, p-537-546, 2001.

SWYNGHDEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev.**, v.79, p.215-262, 1999.

TANAKA, H. et al. Cardiovascular events in pregnancy with hypertrophic cardiomyopathy. **Circ J.**, v.79, p.2502-2506, 2014.

TAYLOR, P.B.; TANG, Q. - Development of isoproterenol induce cardiac hypertrophy. **Can J Physiol.**, v.62, p.384-9, 1984.

THOMPSON, C.; et al. Birth weight and the risk of depression disorder in late life. **Br J Psychiatry**, v.179, p.450-455, 2001.

TOMLINSON, K.C.; et al. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacol Ver.**, v.44, p.103–150, 1992.

TOKGÖZOĞLU, L. Atherosclerosis and the role of inflammation. **Türk Kardiyol Dern**, v.37, p.1-6, 2009.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova.**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

WATANABE, K. et al. Role of differential signaling pathways and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. **Curr Cardiol Rev.**, v.6, n.4, p.290-90, 2010.

WEST, N.A.; et al. Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. **Diabetologia.**, v.54, n.3, p.504-507, 2011.

WOLLERT, K.C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart Fail Rev**, v.7, p.317-25, 2002.

WOLLERT, K.C. et al. Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. **Hypertension**, v.39, n.1, p.87-92, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable disease**, 2014.

YAN, S.F.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A.M. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab.**, v.4, n.5, p.285-293, 2008.

YANG, J.; et. al. Feed-forward signaling of Tnf-alpha and Nf-kappa B via ikk-beta pathway contributes to insulin resistance and coronary arteriolar dysfunction in type 2 diabeticmice. **Am j physiol heart circ physiol.**,v.296, n.6, p. h1850-8, 2009.

YEH, C.H.; et al. HO-1 activation can attenuate cardiomyocytic apoptosis via inhibition of NF-kappaB and AP-1 translocation following cardiac global ischemia and reperfusion. **J Surg Res.**, v.155, p.147-156, 2009.

YAMAGISHI, S. et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochim Biophys Acta Gen Subj.**, v.1820, n.5, p.663-671, 2012.

ZAK, R. Growth of the heart and health and disease. **Raven Press**, 1984.

ZHANG, G.X. et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. **Cardiovasc. Res.**, v. 65, p.230-238, 2005.

ZHANG, C.; et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.26, p.475-480, 2006.

ZHAO, J.; RANDIVE, R.; STEWART, J.A. Molecular mechanisms of AGE/RAGE-mediated fibrosis in the diabetic heart. **World J Diabetes.**, v.5, p.6,

5. ARTIGO I

EFEITOS DA HIPERTROFIA CARDÍACA MATERNA SOBRE PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS DA PROLE ADULTA

Teixeira-Silva JJ ^a; Santos GMRF ^a; Aguiar-Júnior FCA ^b; Xavier FE ^a; Silva CO ^c;

Duarte GP ^a.

^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

^b Núcleo de Ciências Biológicas, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco
(CAV/UFPE), Brasil.

^c Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE),
Brasil.

Resumo

Introdução: A hipertrofia cardíaca (HC) constitui um risco em potencial no período gestacional, contudo os estudos que correlacionem o processo hipertrófico cardíaco durante a gestação e lactação, e o impacto dessas alterações na prole adulta são poucos.

Objetivos: Avaliar a influência da HC sobre o perfil cardiometabólico da prole aos 6 meses. **Métodos:** Para indução da HC, fêmeas foram tratadas com doses fracionadas de isoproterenol (ISO, 50 mg/kg). Fêmeas do grupo controle receberam apenas o veículo. Após 7 dias de indução o acasalamento foi iniciado. Ao final da gestação e lactação, as proles foram separadas de acordo com o tratamento materno em dois grupos experimentais: i) grupo controle (CON); ii) grupo (ISO), prole de fêmeas com hipertrofia cardíaca. **Resultados:** Após validação do modelo experimental, as proles de machos foram estudadas aos 6 meses, verificando-se que a exposição à HC induziu um quadro de intolerância à glicose, aumento dos níveis glicêmicos e alterações no perfil lipídico. Ademais, resultou em alterações morfométricas hepáticas, bem como aumento do número de células de Kupffer. A nível cardíaco, foi constatado aumento da área dos cardiomiócitos (CM's) e maior deposição de colágeno. **Conclusão:** A exposição à HC materna no período intrauterino e na lactação reproduziu na prole adulta, alterações no perfil metabólico e cardíaco.

Palavras-chave: hipertrofia cardíaca; programação fetal; prole.

Abstract

Introduction: Cardiac hypertrophy is a potential risk factor during the gestational period, however, studies that correlate this process during gestation and lactation, as well the impact of these changes on adult offspring are poor. **Aim:** To evaluate the impact of cardiac hypertrophy on the cardiometabolic profile of offspring at 6 months. **Methods:** To induce cardiac hypertrophy, females were treated with fractionated isoproterenol doses (ISO, 50 mg / kg). Females from the control group received only the vehicle. After 7 days of induction the mating was started. At the end of gestation and lactation period, offspring were separated according to maternal treatment in two experimental groups: i) control group, (CON); ii) group (ISO), offspring of females with cardiac hypertrophy. **Results:** After validation of the experimental model, male offspring were studied at 6 months of age. The exposure to offspring to cardiac hypertrophy induced glucose intolerance, increased of glycemic levels and pronounced changes in the lipid profile. In addition, resulted in hepatic morphometric alterations as well an increase in the number of Kupffer cells. At cardiac level, there was an increase in cardiomyocytes area and a higher deposition of collagen in the heart. **Conclusion:** Exposure to maternal cardiac hypertrophy in the intrauterine period as well in the lactation, reproduced in the adult offspring, changes in the metabolic and cardiac profile.

Keywords: cardiac hypertrophy; fetal programming; offspring.

Introdução

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam um dos maiores problemas de saúde pública, estima-se que aproximadamente 23,3 milhões de mortes estarão relacionados a essas doenças no ano de 2030 (1). Neste cenário, a HC patológica representa um evento comum a maioria das doenças do aparelho cardiovascular (2). Ademais, estima-se que 0,5-4% das gestações em países desenvolvidos, cursam com comprometimento da função cardíaca, o qual configura um grave problema de saúde pública (3).

É bem conhecido que a HC constitui um mecanismo adaptativo do coração em situações de sobrecarga funcional (2). Esse fenômeno pode resultar de alterações hemodinâmicas transitórias, como àquelas observadas na gestação, ou ser resultado de alterações hemodinâmicas persistentes (4; 5; 6). Diversos modelos experimentais têm sido utilizados a fim de melhor compreender os mecanismos relacionados ao processo hipertrófico (4), dentre eles merece destaque a indução da HC através da administração de ISO, um agonista beta-adrenérgico não-seletivo (8; 9; 10). Não obstante, os mecanismos moleculares envolvidos na HC durante a gestação e lactação, bem como impacto desta na prole adulta, ainda não claros.

Os modelos animais de lesão do miocárdio induzido pela administração de agonistas adrenérgicos, é uma estratégia para estudar a adaptação estrutural e funcional cardíacos ao processo hipertrófico. As alterações induzidas por ISO podem contribuir para o entendimento dos sinais de transdução, excitabilidade e contratilidade envolvidos na disfunção cardiovascular. Neste trabalho, objetivou-se avaliar as alterações metabólicas e morfológicas cardíacas da prole adulta de ratos expostos aos efeitos de uma HC produzida por ISO.

Métodos

Animais

Foram utilizados animais da linhagem Wistar (240 – 300g) mantidos em temperatura constante ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro horas de 12 horas, livre acesso a água e ração ad libitum. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Institucional (Processo nº 23076.006578/2014-03) e seguiram os cuidados preconizados pelas Diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Obtenção do modelo experimental

Para indução da HC, fêmeas nulíparas foram tratadas com ISO, 50 mg/kg dissolvido em solução salina, dose fracionada 2 vezes ao dia, grupo f-GI) por via intraperitoneal (i.p.). Fêmeas do grupo controle (f-GC) receberam apenas o veículo. Após 7 dias da indução, o acasalamento foi iniciado. Ao final da gestação e lactação as fêmeas foram eutanasiadas, e a prole de machos (6-8 animais por fêmea) foram estudados aos 6 meses de idade e separados de acordo com o tratamento materno em dois grupos experimentais: i) grupo controle (CON), animais oriundos de fêmeas que receberam apenas o veículo; ii) grupo (ISO), prole de fêmeas com HC (Figura 1).

Parâmetros bioquímicos

Aos 6 meses de idade, as proles foram submetidas a jejum de 12 horas, anestesiadas com pentobarbital sódico (PTB, 50 mg/kg, via i.p.). Amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-orbital com auxílio de capilares de vidro. Estas foram centrifugadas a 4000 r.p.m., durante 10 minutos, em temperatura ambiente, para obtenção e determinação dos níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e suas frações com auxílio de kits comerciais (LABTEST®).

Teste de tolerância a glicose (TTG) e teste de resistência à insulina (TRI)

Após jejum de 12 horas, os animais de todos grupos foram anestesiados com PTB (50 mg/kg, via i.p) e amostras de sangue foram coletadas no tempo zero (0), seguido da administração de uma solução contendo 50% de glicose (2g/Kg, via i.p.). A glicemia foi determinada com auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek® Roche Diagnostics) em intervalos subsequentes de 15 a 120 minutos (t15' - t30' - t60' - t90' - t120'). Após 48h do TTG, os animais foram ressubmetidos a jejum de 12 horas, anestesiados, mensurando-se a glicemia de jejum. Após esta etapa, uma dose de 1,5 U/kg de insulina regular (Humulin R – 100U/ml, Lilly) foi administrada via intraperitoneal mensurando-se a glicose em intervalos de 5 a 30 minutos. A razão da constante de decaimento da glicose (KITT) foi calculada usando-se a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O decaimento da glicose foi analisado, com base na queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear.

Determinação dos níveis pressóricos

Os animais foram anestesiados com PTB (50mg/kg, i.p.) e um cateter de polietileno heparinizado foi introduzido na artéria femoral esquerda até o nível da aorta abdominal. Logo em seguida, o cateter foi exteriorizado em nível da nuca. Após 24 horas, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (Power

Lab – AdInstruments), para aferição pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). A pressão arterial média PAM foi calculada utilizando a equação: $PAM = PAD + [(PAS - PAD)/3]$.

Processamento do material biológico e avaliação microscópica

Os corações e fígados foram imersos em formol neutro e tamponado a 10 % (NBF) durante pelo menos 24h. Os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados com xilol, impregnados e incluídos em parafina. Para cada amostra de tecido, foram confeccionados cortes semi-seriados com espessura de 4µm que foram colocados em lâminas lubrificadas com albumina e mantidas em estufa à 37°C durante 24 h. Os cortes histológicos foram submetidos a coloração de Hematoxilina-Eosina (H.E.) para a descrição histomorfométrica preliminar e ao corante vermelho de picro-sírios (picro-sirius red) para determinar os níveis de deposição de colágeno cardíaco.

Análise histomorfométrica

As imagens histológicas foram capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 30 campos por lâmina com aumento final de 400x. As microfotografias foram avaliadas através do software Image J versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Foram avaliados a área de secção transversal e o conteúdo de colágeno. Em relação aos parâmetros hepáticos, foram avaliados o número de hepatócitos, densidade capilar e número de células de Kupffer.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). O teste t pareado e/ou não-pareado foi utilizado. Para análise de bloco foi utilizado a análise de variância (ANOVA) a uma e/ou duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Validação do modelo experimental

Neste trabalho, fêmeas nulíparas foram pré-tratadas com ISO, (50 mg/kg), fracionado duas vezes ao dia, sete dias antes do acasalamento, cujo objetivo foi de promover modificações no ambiente intrauterino relacionados a um quadro hipertrófico. A validação do modelo

experimental foi realizada através do acompanhamento das fêmeas ao final do período de lactação, quando foram eutanasiadas. Como esperado, ver Tabela 1, a relação peso do coração seco /comprimento da tíbia foi aumentada em cerca de 21% nas fêmeas que receberam ISO, grupo f-GI, indicando a ocorrência de uma HC. Além disso, a área de secção transversal (AST, μm^2) dos CM's das fêmeas expostas ao tratamento agudo com ISO, também se encontrava aumentada (Figura 2). Por outro lado, ambos os grupos experimentais apresentaram um número similar de animais por prole (dados não mostrados). Não foi observada mortalidade na prole de fêmeas com HC.

Parâmetros biométricos da prole

A Tabela 2 mostra os parâmetros biométricos da prole ao nascimento, aos 3 e 6 meses de idade. A exposição intrauterina a um quadro hipertrófica não alterou o peso corporal e o comprimento naso-caudal em todas as idades avaliadas.

Parâmetros bioquímicos da prole adulta

Aos 6 meses de idade a prole exposta a HC (grupo ISO) apresentaram níveis glicêmicos significativamente maiores ($p < 0,05$) do que o grupo CON. Entretanto, foi observado níveis significativamente reduzidos de triglicerídeos, colesterol total e HDL-c (Tabela 3).

A fim de avaliar o impacto da exposição intrauterina à hipertrofia materna, foram analisados a tolerância à glicose (Figura 3) e a resistência à insulina (Figura 4) em ambos os grupos experimentais. Aos 6 meses, a prole das fêmeas f-GI, apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) no teste de TTG, nos intervalos de tempo de 15 e 30 min, quando comparados ao CON (Figura 3A). Estes resultados foram confirmados através do cálculo da área sob a curva (Figura 3B). Não obstante, não foram observadas diferenças significativa no TRI (Figura 4A) e na KITT (Figura 4C). Por outro lado, o cálculo da área sob a curva no grupo ISO estava significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao seu respectivo controle.

Histomorfometria hepática da prole adulta

Aos 6 meses de idade foi mensurada a massa hepática, a densidade de hepatócitos e o número de células de Kupffer. Em relação a massa hepática (g), foi observado que os grupos GI ($9,0 \pm 0,32$) apresentou uma redução significativa ($p < 0,001$) deste parâmetro, quando comparados ao CON ($12 \pm 0,32$). Ainda, foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) do número de hepatócitos (Figura 3A) e células de Kupffer (Figura 3B).

Efeitos da hipertrofia cardíaca materna sobre os níveis pressóricos e frequência cardíaca da prole adulta

Em animais não anestesiados, verificou-se que a PAS, PAD e PAM foi similar em todos os grupos registrados, porém a FC foi aumentada significativamente ($p < 0,05$) no grupo ISO quando comparado ao grupo CON (Tabela 4).

Histomorfometria cardíaca da prole adulta

A massa cardíaca e o índice de hipertrofia cardíaca (IHC) (relação: diâmetro dos CMs/diâmetro do núcleo) foram avaliados na prole adulta. O peso do coração foi similar em todos os grupos aos 6 meses de idade (dados não mostrados). Ademais, foi constatado um aumento de 13% no IHC da prole ISO quando comparada ao seu respectivo controle (Figura 6). O conteúdo do colágeno também foi avaliado em todos os grupos experimentais aos 6 meses de idade, observando-se que foi significativamente aumentado ($p < 0,001$) na prole de fêmeas com HC (Figura 7).

Discussão

Evidências epidemiológicas e experimentais reforçam a hipótese de que eventos adversos no ambiente intrauterino, influenciam o desenvolvimento fetal, resultando em alterações persistentes na estrutura e função de diversos sistemas da prole adulta (10-13). Ambientes maternos desfavoráveis, como àqueles observados na presença da HC materna, têm sido relacionados a elevadas taxas de morbimortalidade (14), entretanto o seu prognóstico, bem como o impacto desta sobre a prole ainda não são claros. Este estudo foi desenhado para investigar o grau de severidade dos impactos de uma HC durante a gestação e lactação sobre parâmetros cardiometabólicos da prole adulta.

Como previamente relatado por nossa equipe a administração de ISO promove HC (15,16) em doses consideradas baixas, médias e elevadas (17,18). Neste estudo, a HC promovida nas progenitoras foi caracterizada pelo aumento da relação peso do coração seco/ comprimento da tibia. O ISO é um potente agonista β -adrenérgico que em doses elevadas aumenta a contratilidade e FC, ativando outros sistemas neuro-humorais, como o sistema renina angiotensina aldosterona (19), promovendo uma sobrecarga de cálcio (20), além de ativar a fosfolipase e causar decomposição dos fosfolipídios de membrana. A estimulação por ISO também promove uma redução de resistência vascular e da PA, especialmente a PAD(21), o que pode levar a isquemia do miocárdio e ao aumento de

radicais livres derivados de xantina oxidase, induzindo peroxidação de membranas celulares com destruição da mesma e apoptose (8).

A intolerância à glicose, possivelmente está relacionada ao dano hepático e ao aumento do estresse oxidativo, presente em nosso modelo. No tecido cardíaco e hepático, o ISO promove depleção enzimática, e consequente aumento de biomarcadores de injúria miocárdica e hepatotoxicidade (22). Nesse contexto, as alterações no metabolismo da glicose e dos lipídeos, possivelmente estão relacionadas a alterações morfofuncionais hepáticas encontradas nas proles expostas a hipertrofia cardíaca, tais como perda de massa, hiperplasia de hepatócitos com redução de volume, alterações na densidade de vasos hepáticos (dados não mostrados), bem como infiltrado de macrófagos. A nível hepático, o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) produzido pelas células de Kupffer, é um importante determinante de disfunção hepatocelular (23). A nossa hipótese, é que o aumento do infiltrado inflamatório hepático, encontrado na prole adulta, provavelmente está relacionado a maiores níveis de TNF-alfa, os quais contribuem para os processos de apoptose e necrose tecidual, além de hiperplasia dos hepatócitos. O TNF- α possui um papel central no início e na sustentação de diversas cascatas inflamatórias, contribuindo para o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias com interleucina 6 e interleucina 1, podendo aumentar os níveis de EROS (24).

É bem conhecido que condições gestacionais adversas como o diabetes (25) e a hipertensão (26) materna resultam em hipertrofia cardíaca na prole adulta. Dentro do cenário observado é evidente o desencadimento do processo de remodelagem cardíaca com todas suas implicações. Nossos dados reforçam a importância do meio intra-uterino adverso resulta em alterações na FC, HC e maior deposição de colágeno no coração da prole adulta. À luz dos nossos achados, estratégias terapêuticas devem ser tomadas em consideração para controlar as cardiopatias na gestação, em função da proteção da prole.

Conclusão

Juntos esses achados fornecem evidências que as alterações ocorridas durante a gestação, em decorrência da presença da HC se reproduzem na prole como alterações no perfil metabólico e cardíaco.

Financiamento: CAPES/CNPq

Referências

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable disease**, 2014.
2. BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, v. 128, n. 1, p. 191–227, 2010.
3. REGITZ-ZAGROSEK, V. et al. ESC guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy: The Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J.**, v.32, n.24, p.3147-3197, 2011.
4. MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. Cardiac hypertrophy. **Rev Bras Hipertension.**, v.8, p. 63-75, 2001.
5. OLIVEIRA, E.M.; KRIEGER, J.E. HC e treinamento físico: Aspectos moleculares. **Hipertensão**, v.5, p.73-78, 2002.
6. FERNANDES, T.; SOCI, U.P.; OLIVEIRA, E.M. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. **Braz J Med Biol Res**, v.44, n.8, p.836-847, 2011.
7. TAYLOR, P.B.; TANG, Q. - Development of isoproterenol induce cardiac hypertrophy. **Can J Physiol.**, v.62, p.384-9, 1984.
8. GARG, M.; KHANNA, D. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, 2014.
9. HERMANN, et al. Isoproterenol effects evaluated in heart slices of human and rat in comparison to rat heart in vivo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.274, p.302-312, 2014.

10. BARKER, D.J.P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v.1, n.8489, p.1077-1081, 1986.
11. BARKER, D.J.P. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **Br Med J**, v. 298, p.564-567, 1989.
12. CAPRA, L. et al. The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation. **Journal of Pediatrics**, v.39, n.7, p.1-12, 2013.
13. HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Developmental Origins of Health and Disease - Global public health implications. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.29, p.24-31, 2015.
14. TANAKA, H. et al. Cardiovascular events in pregnancy with hypertrophic cardiomyopathy. **Circ J**, v.79, p.2502-2506, 2014.
15. LAHLOU, S. et al. Effects of long-term pretreatment with isoproterenol on bromocriptine-induced tachycardia in conscious rats. **Can J Physiol Pharmacol.**, v.78 n.3, p.260-265, 2000.
16. SILVA, C.O. et al. Effects of long-term pretreatment with isoproterenol on inotropic responsiveness to alpha-adrenoceptor stimulation: study in isolated perfused rat hearts. **J Pharm Pharmacol.**, v.53, n.2, p.233-42, 2001.
17. KNUFMAN, N.M. et al. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol treated rats. **Res. Comm. Chem. Pharmacol.**, v.57, p.15-32, 1987.
18. NICHTOVA Z. et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. **Gen Physiol Biophys.**, v.3, n.12, p.141-51, 2012.

19. NAGANO, M. et al. Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol induced left ventricular hypertrophy. **Hypertension.**, v.19, p.708–712, 1992.
20. Tang X, Qin Q, Xiaobin Xie. Protective effect of sRAGE on fetal development in pregnant rats with gestational diabetes mellitus. **Cell Biochem Biophys.**, v.71, p.549-556, 2015.
21. LIJNEN PJ, PETROV VV, FAGARD RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta (1). **Mol Genet Metab.**, v.71, p.418-35, 2000.
22. THIRUPURASUNDARI, C.J. et al. Liver architecture maintenance by tincture of Crataegus against isoproterenol-induced myocardially infarcted rats. **J Med Food**, v.8, n.3, p. 400-4, 2005.
23. LASO, F.J. et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. **Hepatology**, 1997.
24. ZHANG, G.X. et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. **Cardiovasc Res.**, v.65, n.1, p.230-238, 2005.
25. ARMSTRONG, D.W. et al. Gestational hypertension and the developmental origins of cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction. **Mol Cell Biochem.**, v.391, p.201-209, 2014.
26. DOWLING, D. et al. Cardiomyopathy in offspring of pregestational diabetic mouse pregnancy. **J Diabetes Res.**, 2014.

Figura 1. Desenho experimental.

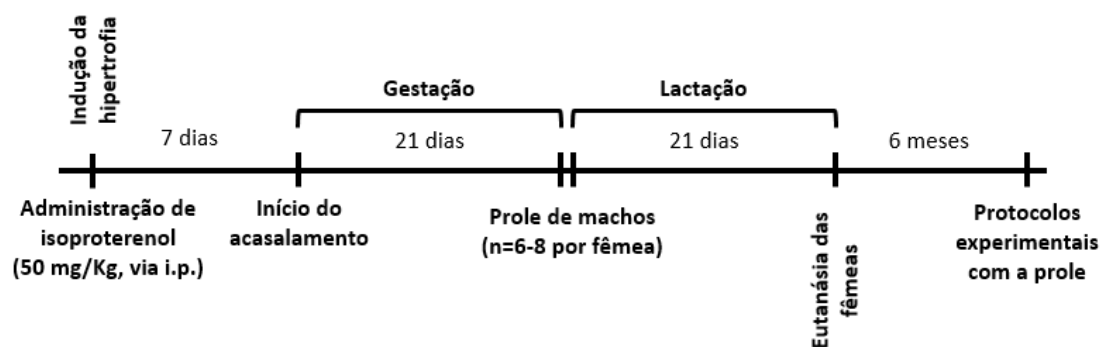


Tabela 1. Peso corporal (PC), peso dos ventrículos secos (PVS), peso dos ventrículos úmidos (PVU) e índice de hipertrofia cardíaca (IHC) das fêmeas ao final da lactação.

Parâmetros	f-GC	f-GI
Peso corporal (g)	280 ± 2,6	290 ± 3
PVS (mg)	140 ± 3,7	170 ± 2 **
PVU (mg)	630 ± 24	810 ± 19 **
IHC (mg/mm) [PS/tíbia]	35 ± 0,75	43 ± 0,8 ***

Os valores representam média ± e.p.m; n = 6; **p<0,01; *** p < 0,001 vs. f-GC (Teste t de Student não pareado).

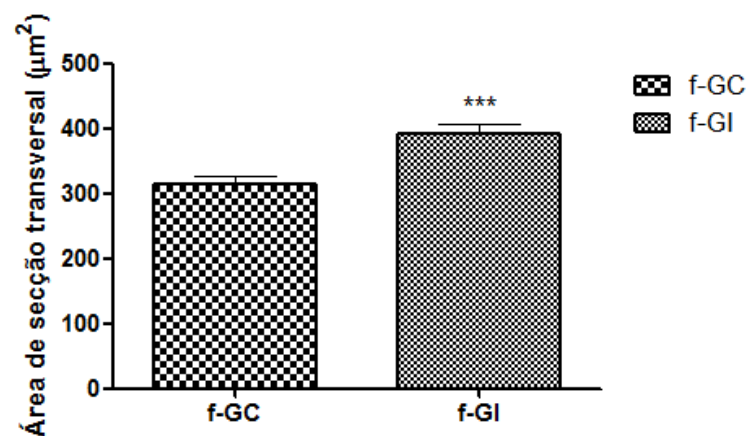


Figura 2. Validação do modelo experimental – área de secção transversal (μm^2) dos CM's de fêmeas após tratamento com ISO (50mg/Kg). Os valores representam média $\pm$ e.p.m; n = 6; *** p < 0,001 vs. f-GC (Teste t de Student não pareado).

Tabela 2. Efeitos da HC materna sobre os parâmetros biométricos da prole.

	Peso corporal (g)			Comprimento naso-caudal (cm)		
	Ao nascimento	3 meses	6 meses	Ao nascimento	3 meses	6 meses
CON	6,5 ± 0,07	336,8 ± 7,8	406,0 ± 5,1	6,3 ± 0,2	38,8 ± 0,7	44,5 ± 0,4
ISO	6,4 ± 0,1	314,0 ± 5,2	387,0 ± 15,0	6,5 ± 0,07	40,1 ± 0,5	44,6 ± 0,4

Os valores representam média ± e.p.m; n = 10 ratos por grupo; * p > 0,05; vs. CON (Teste t de Student não pareado).

Tabela 3. Efeitos da HC materna sobre o perfil bioquímico da prole aos 6 meses de idade.

Parâmetros bioquímicos (mg/dL)	CON	ISO
Glicose	80,0 ± 1,8	100,0 ± 6,1 *
TG	53,0 ± 8,5	29,0 ± 4,6***
CT	69,0 ± 1,2	53,0 ± 1,6 ***
HDL	35,0 ± 0,95	31,0 ± 1,5 *

Os valores representam média ± e.p.m; n = 10 ratos por grupo; * p < 0,05; *** p < 0,001 vs. CON (Teste t de Student não pareado). Legenda: TG: triglicerídeos; CT: colesterol total; HDL-c: lipoproteína de alta densidade.

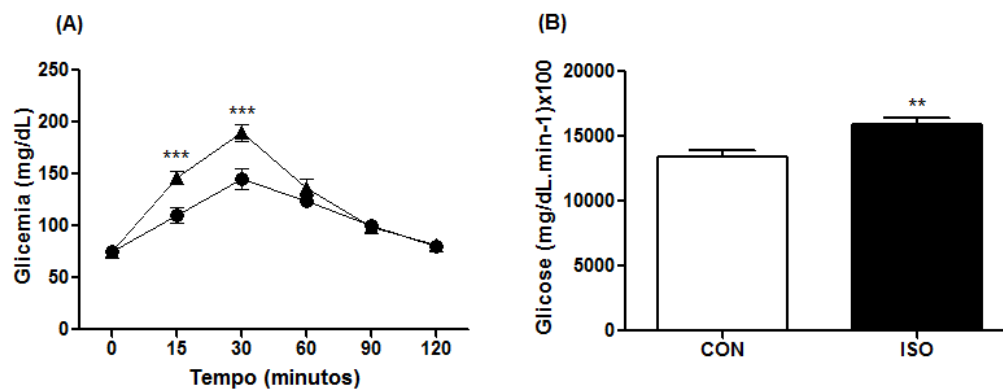


Figura 3. Teste de tolerância à glicose (TTG) (A) e área sob a curva (AUC) (B) aos 6 meses de idade. Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $n = 10$ ratos por grupo; **A:** *** $p < 0,001$ t 15' e t 30' vs. CON.(ANOVA a duas vias, pós-teste: Bonferroni). **B:** ** $p < 0,01$; vs. CON (Test t de Studente não pareado).

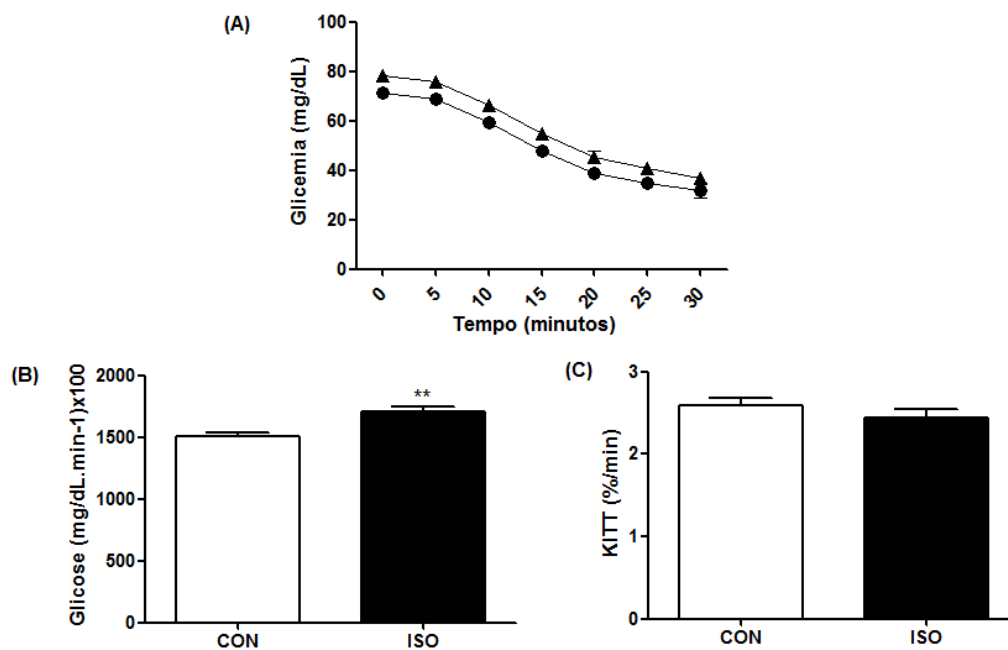


Figura 4. Teste de resistência à insulina (TRI) (A), área sob a curva (AUC) (B) e constante de decaimento da insulina (KITT) (C) na prole aos 6 meses de idade. Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $n = 10$ ratos por grupo; **A e C:** $p > 0,05$ vs. CON. **B:** ** $p < 0,01$; vs. CON (Teste t de Student não pareado).

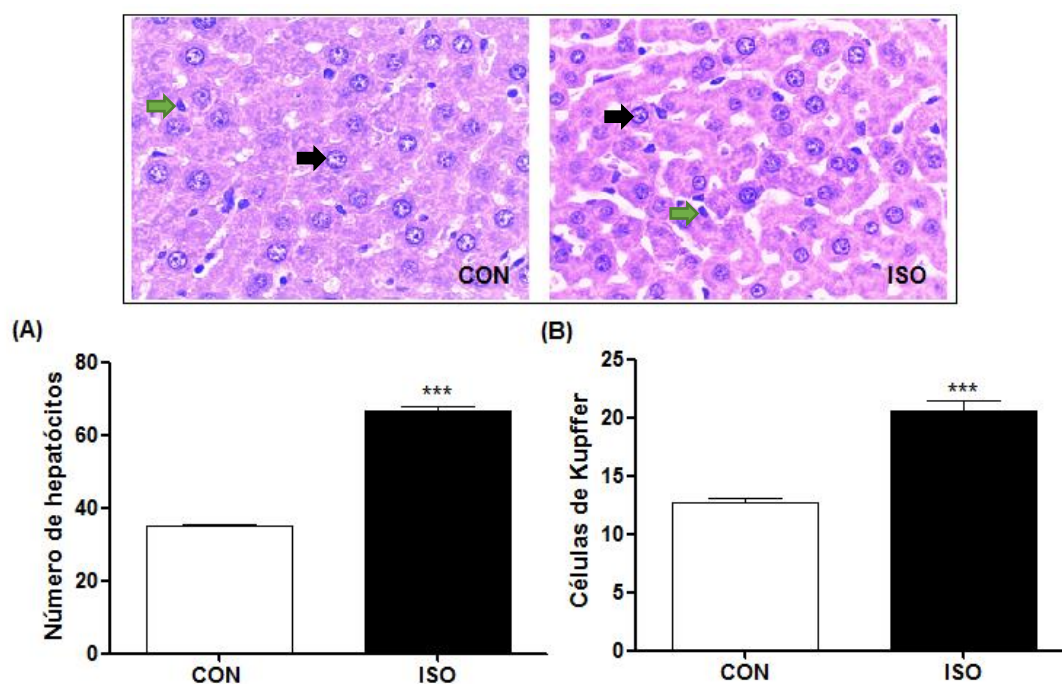


Figura 5. Fotomicrografia de uma secção do fígado da prole aos 6 meses de idade. As secções foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e ampliadas 400 x, visualização a luz normal. Os valores representam média $\pm$ e.p.m; n = 6 ratos por grupo, 180 campos analisados. **A e B:** CON (branco), ISO (preto). As setas pretas indicam os hepatócitos, setas verdes indicam as células de Kupffer. Figura **A e B:** *** p<0,001 vs. CON; Teste t de Student não pareado).

Tabela 4. Níveis pressóricos e FC da prole adulta de fêmeas com HC.

Parâmetros	CON	ISO
PAS (mm Hg)	110 ± 0,8	110 ± 2,1
PAD (mm Hg)	80, ± 0,6	85 ± 1,1
PAM (mm Hg)	90 ± 1,4	93 ± 1,2
FC (b.p.m.)	310 ± 6,2	350 ± 16*

Os valores representam média ± e.p.m; n = 5; Legenda: Pressão arterial sistólica (PAS); pressão arterial diastólica (PAD); pressão arterial média (PAM); frequência cardíaca (FC), * p < 0,05 vs. CON (Teste t de Student não pareado).

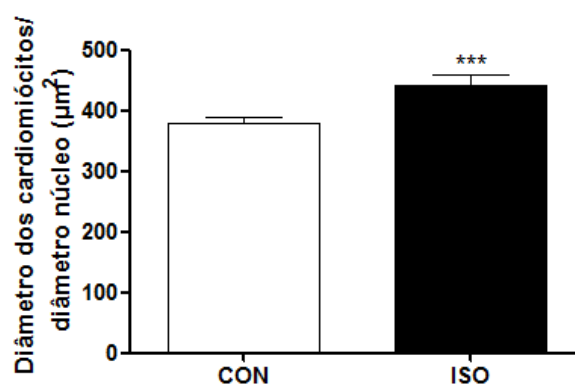
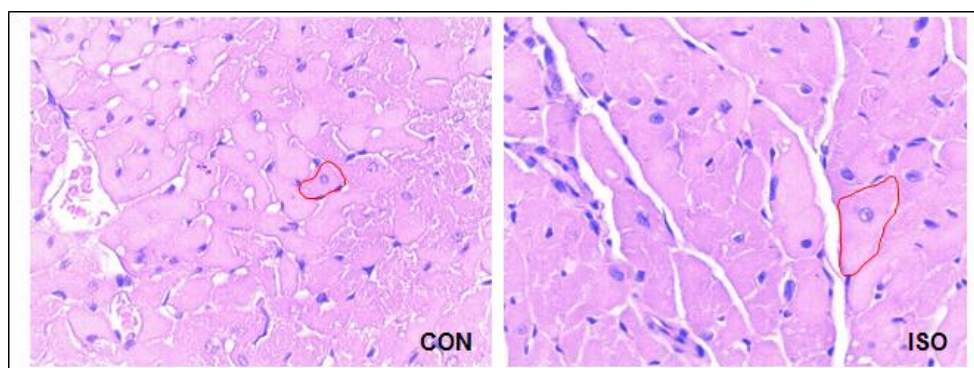


Figura 6. Microfografia representativa da secção do miocárdio corada por hematoxilina-eosina (HE, 400x) vista a luz normal. Razão entre o diâmetro dos CM's e o diâmetro do seu respectivo núcleo (em μm^2). Os valores representam média $\pm$ e.p.m; n = 5 ratos por grupo; 150 campos analisados. Legenda: CON (barra branca), ISO (barra preta). *** p < 0,001 vs. CON (Teste t de Student não pareado).

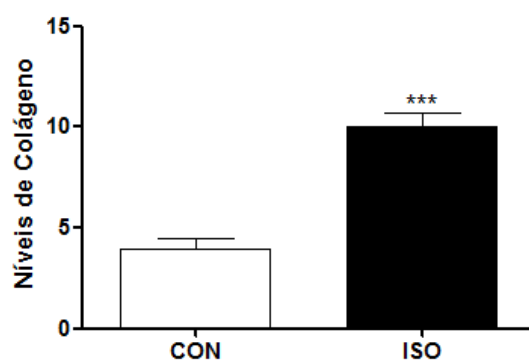
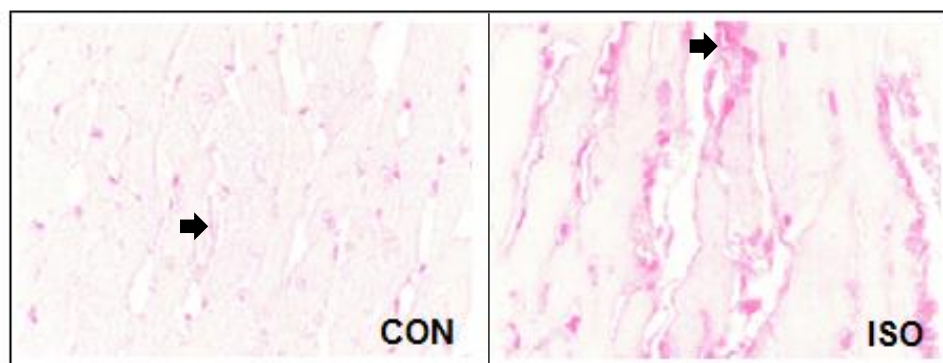


Figura 7. Fotomicrografia do tecido cardíaco da prole aos 6 meses de idade. As setas indicam os níveis de colágeno cardíaco. Representação da prole de animais controle (CON) e grupo isoproterenol (ISO). As secções foram coradas com vermelho picrosirius (ampliação de 400 x) e vistas a luz normal. Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $n = 5$ ratos por grupo; 150 campos analisados. Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ vs. CON (Teste t de Student não pareado).

6. ARTIGO II

EXPOSURE TO MATERNAL HYPERGLYCEMIA CONTRIBUTES TO IMPAIRMENT OF B-ADRENERGIC SIGNALING AND INCREMENT OF OXIDATIVE STRESS IN THE OFFSPRING HEART

Teixeira-Silva JJ ^a, Santos GMRF ^a, Oliveira DRF ^a, Aguiar-Júnior FCA ^b, Barreto-Chaves MLM ^c, Xavier FE ^a, Lahlou MS ^d, Silva CO ^a, Duarte GP ^a

^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil.

^b Núcleo de Ciências Biológicas, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil.

^c Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), Brazil.

^d Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Brazil.

New & Noteworthy

This study shows that the exposure to maternal hyperglycemia during pregnancy and postnatal period induces cardiac dysfunction, characterized by decrease of sensibility to isoproterenol (ISO), a non-selective β -adrenoceptor agonist, in the offspring heart at 6 months of age. Furthermore, these animals showed an imbalance between free radicals and endogenous antioxidant systems and upregulation of RAGE/NOX4, which results in hypertrophy and enhanced interstitial collagen deposition in the heart

Introduction

Diabetes mellitus is a major threat to human health in the 21st century (11). An estimate 382 million adults globally were burdened by this chronic disease in 2013; this number is expected to rise to 592 million by 2035, especially in the development countries (2). Diabetes itself increase the risk of cardiac morbidity and mortality, independent of other risk factors such as hypertension and coronary artery disease (3), as well contributes to a higher prevalence of diabetic cardiomyopathy (4, 5).

The association between maternal hyperglycemia, perinatal complications and long-term ailment to mothers and progeny is gaining increased attention in a globally scope. Impairment of glucose homeostasis is a common complication in pregnancy and it is

estimated to affect approximately (< 1–28%) of pregnancies (6). Epidemiological and experimental evidences, support the hypothesis that exposure to an unfavorable environment during critical and sensitive periods of development, would be associated with an increased risk of diseases in the adulthood descendants (7-11). In this perspective, studies that relate the impact of maternal hyperglycemia on the functional and morphological parameters in the adult offspring heart remains scarce.

It is widely disseminated the concept that the development and progression of diabetic complications are frequently attributed to imbalance between reactive species and endogenous biological antioxidant systems which results in damage in diverse substrates, as carbohydrates, proteins, lipids and nitrogenous bases (12-14). Additionally, the development of various pathological process, such as cardiac hypertrophy (15) and heart failure (16) are accompanied by impaired of redox status. Several mechanisms are involved in the genesis of the diabetic cardiomyopathy as activation of the receptor of advanced glycation end products (RAGE) (17-19) and the increase of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase (NADPH)-oxidase activity in the diabetic heart (20). Furthermore, recent data suggest a crosstalk between RAGE/NOX pathway in the diabetic cardiovascular complications (21).

Our hypothesis is that the exposure to maternal hyperglycemia would be able to impair the β -adrenergic signaling and increase the oxidative stress by upregulation of RAGE/NOX4 pathway in the offspring heart in adulthood.

Materials and methods

Animals

Male and female Wistar rats (200-300 g) were obtained from colonies maintained in the animal facility at Federal University of Pernambuco (UFPE). Both housing and care of laboratory animals were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research set forth by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at UFPE (approval reference number: n° 23076.006578/2014-03).

Establishment of rat model of maternal hyperglycemia

Hyperglycemia was induced in female Wistar rats by a single dose intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ: 50 mg/kg, Sigma Aldrich®) dissolved in sodium citrate buffer (0,1 M, pH 4.5) on the 7th day of pregnancy. Control female rats received only

vehicle. Treatment was confirmed 48 hours after diabetes induction by measuring glucose concentrations (Optium Mini®). Were considered diabetic the female rats that presented glycaemia levels higher than 250 mg/dL. After that, the female animals were separated in individual cages, into two different groups: female control rats (f-CR, n = 10) and female diabetic rats (f-DR, n=20). After birth, the male offspring were restricted to six animals per mother. At the end of lactation, parameters such as body weight, blood glucose and maternal/offspring mortality were measured (see figure 1).

Experimental design

Male rats were assigned in accordance to maternal treatment into 2 experimental groups: O-CR (offspring of control rats, n=6-8 animals per group) and O-DR (offspring of diabetic rats, n=6-8 animals per group), and evaluated at 3 and 6 months of age (see figure 1). To validate our experimental model, biometric parameters and biochemical parameters were measured.

Assessment of cardiac function

At 6 months of age, the offspring rats were submitted to catheterization procedures under pentobarbital (PTB, 50mg/Kg⁻¹) anesthesia. In order to analyze hemodynamic parameters, the polyethylene catheter (PE10 coupled to PE50, filled with heparin [125 UI. mL⁻¹] diluted in saline 0,9%) was insert into the abdominal aorta via the left femoral artery. Postoperatively, animals were kept in individual cages and treated with antibiotics (Penicillin, 20.000 U) for 24 hours. After that, arterial pressure was measured in conscious, freely moving rats. The arterial cannula was connected to a transducer and the pressure signals were recorded (60 minutes) on a computerized acquisition system (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, New South Wales, Australia) as described by Ramos-Alves and colleagues (11).

Isolated heart preparation (Langendorff)

The method for isolating the beating heart 'ex vivo' was firstly described by Langendorff (22). At 6 months of age, the offspring were anesthetized with pentobarbital (50 mg/Kg). After that, the chest was opened, the hearts were rapidly excised and submerged in ice-cold Krebs-Henseleit solution, before being fixed through the aorta at Langendorff apparatus, under a constant pressure of 80 mmHg. Perfusion was carried out using Krebs-Henseleit solution, composed by NaCl (129 mM), NaHCO₃ (21 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), KCl (5.6 mM), MgCl₂.6 H₂O (1.25 mM), CaCl₂.2 H₂O (1.25 mM). Glucose (10 mM) as

substrate and sodium pyruvate (2 mM) as co-substrate to preserve the myocardium performance. This solution was gassed with a mixture of 95% O₂ + 5% CO₂, pH 7.4. The temperature was maintained at 37 °C. A collapsed latex balloon was introduced in the left ventricular cavity via an incision in the left atrium. The balloon was connected to a transducer coupled to a signal amplifier. Data were transmitted to a data acquisition program (Power Lab model ML870 8/30, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, New South Wales, Australia). The system allowed the measurement of systolic left ventricular pressure (LVSP) and heart rate (HR).

Preparation of heart homogenates

On the day of the experiment, all the animals were sacrificed by decapitation under PTB (50mg/Kg⁻¹) anesthesia. The hearts of the animals were removed quickly and carefully, washed in cold saline solution (NaCl 0,9%), dried on filter paper and finally stored in a freezer at -80°C for later analysis. Subsequently, the tissue specimens were homogenized at a frequency of 30 Hz for 1.5 minutes, in a sample disruption apparatus (TissueLyser II, QUIAGEN, Germany). Samples were extracted using specific buffers according to the experimental protocol.

Tissue processing for measurement of oxidative stress

The hearts (50 mg) were using a Tris-base (50mM) + EDTA (1 mM) buffer, with protease inhibitors: fenilmetilsufonil floride (PMSF) and orthovanadate (ORT). Then the samples were centrifuged for 10 min at 1000g, at a temperature of 4 ° C.

Reactive oxygen species quantification

The estimative of reactive oxygen species (ROS) levels were measured through a fluorometric reaction between cardiac supernatant (50 µL) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) reagent (50 µL) in polystyrene 96-well plate, incubated for 45 minutes, at 37°C. The final product was converted into a highly fluorescent compost DCF in the presence of ROS, as described per Nijmeh and colleagues (23). Fluorescence was measured at 504 nm (excitation) and 529 nm (emission). Values were reported as fluorescence units (F) per mg of protein.

Estimative of nitric oxide production

Nitrite levels were estimated using the reagent of Gries, which acts as an indicator of nitric oxide (NO) production, as described by Green and colleagues (24). Similar volumes

(50 μ L) of heart supernatant and reagent were used. The reaction occurred for 10 min at room temperature (± 22 $^{\circ}$ C), the absorbance of the final product of this reaction was measured at a wavelength of 540 nm in a plate reader, as described above. The results were expressed as nmol per mg of protein.

Antioxidant profile

The total activity of superoxide dismutase (t-SOD) was performed according to the methodology proposed by Misra and Fridovich (25). Triplicates of cardiac supernatants (60 μ L) were formerly incubate at 37 $^{\circ}$ C, followed by addition of sodium carbonate buffer (920 μ L per sample, 0.05%, pH=10.2) in 0,1 mM EDTA. The reaction was started by adding 20 μ L of epinephrine (150 mM) diluted in acetic acid (0.05%). Absorbance changes per 15 second (s) intervals for 3 min, at 480 nm, were measured. Furthermore, the catalase (CAT) activity was performed according to Aebi (26), to this reaction were used triplicates of cardiac supernatants (60 μ L) followed by addition of 905 μ L of sodium phosphate buffer (pH = 7.0) and addition of 35 μ L hydrogen peroxide (H_2O_2 , 300mM). Absorbance changes per 10 s intervals for 3 min, at 240 nm, were measured. Both, t-SOD and CAT levels were expressed as units (U) per mg of protein.

The reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels were estimated according to Hissin and Hilfi (27). Quantification of GSH levels were performed by addition of phosphate buffer (100 mM) + EDTA (5 mM), pH= 8.0 + cardiac supernatant (50 μ L). Then, 50 μ L of this mix + 140 μ L of phosphate buffer (100 mM) + 10 μ L of orthophtaldehyde solution (OPT) were pipetted into 96-well plate, incubated for 20 minutes at room temperature (± 22 $^{\circ}$ C). Regarding levels of GSSG, cardiac supernatants (50 μ L) were previously incubated with N-ethylmaleimide (NEM, 20 μ L, 0.04M), 30 min, at room temperature (± 22 $^{\circ}$ C). Subsequently, was added 430 μ L of sodium hydroxide (NaOH, 0,1M). Then, 50 μ L of this mixture + 140 μ L of NaOH + 10 μ L OPT were placed in 96-weel plates. Both, GSG and GSSG levels were reading at 350 nm. The values were expressed as micromol (μ mol) per mg of protein regarding respective standard curves.

Protein analysis

The RAGE and NOX4 protein expression levels was measured in cardiac tissue at 3 and 6 months of age. The hearts (100 mg), were homogenized using an extraction buffer (pH=7,4) composed by KCl (3M), HEPES (1M), $MgCl_2$ (1M), EDTA (0,5M), DTT (1M), glicerol 10% and SDS 10%, with added protease inhibitor: ORT (1 mg/mL), PMSF (1 mg/mL), pepstatin (PEP,1 mg/mL), aprotinin (APT, 1 mg/mL) and leupeptin (LEU,

1mg/mL). Then the samples were centrifuged for 10 min at 10000g, at a temperature of 0 ° C. The protein concentration was performed according to the methodology proposed by Bradford (28). Samples (40 µg of protein) were run on 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis), transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare®, Brasil Ltda) using the Mini Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio Rad®, Foster City, CA, USA). Membranes were previously blocked with of nonfat dry milk (0,5%) dissolved in Tris-buffered saline Tween 20 (TBST) (0.05M Tris, 0.15M NaCl, pH 7.5 and 1% Tween-20). Subsequently the membranes were incubated overnight with anti RAGE (1:500), anti NOX4 (1:500), anti glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 1:10.000) primary antibodies (Cell Signaling®) and with individual horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare®, Brasil Ltda). The resolved bands were scanned using a ChemiDoc MP System Software and quantified using Image Lab Software, version 5.2.1 (Bio Rad®, Foster City, CA, USA).

Histological analysis

The cardiac ventricles were put into a formaldehyde solution 10% neutral buffered (NBF) for at least 24 hours. Subsequently, the tissue specimens were dehydrated in ethyl alcohol at increasing concentrations, diaphanized with xylene, embed and impregnated with paraffin. For each tissue sample, were made cross-sections (4 µm) and then were placed on slides lubricated with albumin and maintained at 37°C for 24 h. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin (H.E.) to measure the cross-sectional area of the cardiomyocyte size. After that, the sections were stained with PicroSirius Red to determine the cardiac collagen levels as described by Junqueira (29). Sections were randomly selected, and analyzed in blind. Myocyte size and collagen levels were made using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analysis

All data sets were expressed as means ± standard deviation (SD). Statistical significance was evaluated by unpaired Student t-test or one-way/two-way ANOVA test followed by Bonferroni comparison test, were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad 5 Software®, San Diego, CA, USA). Probability values less-than or equal to ($P \leq 0.05$) were considered significant.

Results

Hyperglycemia induced by streptozotocin is associated with maternal weight loss, maternal hyperglycemia and increased mortality rate in the offspring during pregnancy and lactation. In order to validate our experimental model (Table 1), female rats that were exposed to hyperglycemia displayed a significant reduction of body weight at the end of lactation (f-DR: 210 ± 11 g vs. f-CR: $280 \pm 2,6$ g). Furthermore, in the same period the females from diabetic group showed a significant increase of glycemia levels (f-DR: 460 ± 14 mg/dL vs. f-CR: $82 \pm 2,1$ mg/dL), as well, polydipsia, polyuria and polyphagia than compared with norm glycemic female group (data not shown).

Exposure to maternal hyperglycemia is associated with changes in biometric parameters in the offspring at birth, 3 and 6 months of age. As a result of the exposition to hyperglycemia in the periods of pregnancy and lactation, the offspring of diabetic mother (O-DR) showed a decrease of body weight at birth (O-DR: $5,6 \pm 0,2$ g vs. O-CR: $6,5 \pm 0,07$ g) which persisted after weaning and throughout their entire life when compared with O-CR group (► At 3 months, O-DR: $267,8 \pm 7,9$ g vs. O-CR: $336,8 \pm 7,8$ g; ► At 6 months, O-DR: $329,1 \pm 7$ g vs. O-CR: $406 \pm 5,1$ g). On the other hand, the body length was similar in both O-DR and O-CR groups (Table 2).

Exposure to maternal hyperglycemia is associated with changes in biochemical parameters in the offspring at 3 and 6 months of age. Our data provides significant evidences that, maternal hyperglycemia induced by STZ, not only impaired the glucose homeostasis, but also impaired the lipid metabolism in offspring at 3 and 6 months of age, characterized by a significant increase of triglycerides (TG) and increase of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) levels, as well a significant decrease of high density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels. Nevertheless, there was not statistical difference in fasting glucose levels in the evaluated ages (Table 3).

Intrauterine and postnatal exposure to maternal hyperglycemia induce hemodynamic alterations in the offspring at 6 months of age. In order to check hemodynamic parameters in the offspring, the arterial pressure was measured in conscious and freely moving rats. At 6 months of age, the O-DR group showed an increase of HR when compared with their respective control group (O-DR, $330 \pm 2,7$ bpm vs. O-CR, $310 \pm 3,5$ bpm). Parallel to this, there was not observed statistical difference in the SAP, DAP and MAP in both, O-DR and O-CR group in this period (Table 4).

Exposure to maternal hyperglycemia modifies the cardiac sensibility to ISO in the retrograde perfused heart system at 6 months of age. As expected, isoproterenol infusion (10^{-10} M – 10^{-4} M) was able to invoke an increase in a dose dependent manner in the Δ LVSP levels, as well a positive inotropic effect in both, O-DR and O-CR group. On the other side, the intrauterine and postnatal exposure to maternal hyperglycemia attenuates the sensitivity of OD-R group to ISO in a dose of 10^{-6} and 10^{-4} M when compared to O-CR group (Figure 2A). The baseline of HR was similar in both, O-DR (214 ± 3 bpm) and O-CR (217 ± 6 bpm) groups. On the other hand, comparable to that observed in the contractile response, Δ HR was found decrease in OD-R group (Figure 2C). The analysis of area under the curve (AUC) confirms our results observed in the Langendorff apparatus (Figure 2B ► Δ LVSP, O-DR: 170 ± 11 mmHg vs. O-CR: 380 ± 11 mmHg; Figure 2D ► Δ HR, O-DR: $140 \pm 9,5$ bpm vs. O-CR: $250 \pm 9,2$ bpm).

The correlation between maternal hyperglycemia and oxidative status in offspring at 3 and 6 months of age. As shown in Figure 3A and 3B, the exposure to high glucose during pregnancy and lactation, programs in the hearts offspring, increase of ROS and nitrites levels respectively. Furthermore, the antioxidant capacity has been directly related to maintenance of cardiac health. In our model, we observed a significant decrease in t-SOD (Figure 3C), CAT (Figure 3D) and the ratio between GSH/GSSG (Figure 3E) levels in the O-DR group compared with their respective controls, in both 3 and 6 months of age.

Maternal hyperglycemia promotes upregulation of RAGE/NOX4 in the offspring in an age-dependent manner. O-DR group showed upregulation of RAGE receptor in the heart, at 3 and 6 months of age, when compared to O-CR group (Figure 4A). Furthermore, the cardiac expression of NOX4, one of the largest sources of oxidative stress, was increase in the OD-R group as a result of exposure to maternal hyperglycemia only in 6 months of age (Figure 4B).

Myocyte size and collagen levels are increased in offspring of diabetic mothers at 3 and 6 months of age. Several studies have reported that the imbalance redox contributes to cardiac remodeling. In order to check the impact of the molecular alterations on the morphological cardiac parameters, firstly we proposed to check the diameter of the cardiomyocytes (Figure 5), followed to interstitial collagen deposition levels (Figure 6). In this perspective, the exposure to maternal diabetes not only induces increase of cardiomyocyte size, but also induces increase of collagen levels at 3 and 6 months of age

in a O-DR group when compared with their respective controls. Furthermore, there was not observed statistical difference in heart weight in the evaluated ages (data not shown).

Discussion

Exposure to an unfavorable environment during critical periods of development, would be associated with an increased risk of development of diseases in adulthood (7-9,30). To understand the consequences of the maternal hyperglycemia on the offspring parameters, experimental diabetes was induced by single dose of STZ (50 mg/Kg). In this context, it is important to emphasize that offspring characteristics could be modulated by several variables, as severity of the maternal hyperglycemia, diabetes models, protocols of diabetes induction and different doses of STZ (31,32). In this study, STZ administration, results in a severe diabetes in the females, f-DR group (Table 1). Besides that, we observed a significant increase in the mortality rate of offspring exposed to maternal diabetes (38% higher compared to O-CR group), observed as: abortions, intrauterine absorption, maternal cannibalism or not breastfeeding. Similar results were observed by Song and colleagues (33) in which it was observed a reduction in fetal viability in hyperglycemic conditions. Furthermore, O-DR group showed reduction of the body weight in all ages evaluated (at birth, 3 and 6 months) when compared with this respective control group (O-CR).

It is extensively known that in utero exposure to high glucose is a considerable risk factor to the impairment of metabolic profile. Recently, our research group demonstrated that exposure to maternal hyperglycemia induces impaired of glucose tolerance and insulin resistance in adult offspring (11). Likewise, in this study, maternal hyperglycemia induces considerable disturbances in lipid profile in the O-DR group, characterized by increased TG, CT levels and reduced of HDL levels.

As far as we know, studies that evaluated the impact of maternal hyperglycemia on the adrenergic sensitivity in the adult offspring heart are still scarce. It is extensively known that the sympathetic nervous system plays a central role in both physiological and pathological conditions through β -adrenergic signaling (34,35). Abnormality in this pathway has been demonstrate in experimental diabetes animals, such as a decreased responsiveness of diabetic hearts to stimulation by β -adrenoceptor (β -AR) agonists (36,37). In our model, the exposure to maternal hyperglycemia levels, contributes to reduced sensibility to ISO, a non-selective β -adrenergic agonist drug, as well reduced to contractility rate in the O-DR animals at 6 months of age (Figure 2). In parallel to this,

O-DR group showed a significant increase in the heart rate at 6 months when compared to offspring of control mothers (Table 4). Moreover, our researcher group observed decrease of endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and hyperactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring exposed to maternal diabetes (38).

It is widely accepted that the development and progression of diabetic cardiomyopathy could be a result from an imbalance between free radicals and the ability of the biological system to detoxify reactive intermediates (39). In our study, exposure to maternal hyperglycemia, not only increased the ROS and nitrites levels, but also induced reduction of the activity of SOD, CAT, as well the ratio between GSH/GSSG levels.

In this context, RAGE is a multiligand member of the immunoglobulin superfamily of cell surface molecules, expressed in a wide variety of tissues, including components of the cardiovascular system (40). As a receptor for both, AGEs (advanced glycation end products) and proinflammatory ligands (e.g., members of S100/calgranulin family), RAGE has been investigated as a potential biomarker for several inflammatory conditions (41), including diabetes (42) and cardiovascular diseases (43). In this study, the exposure to maternal hyperglycemia during pregnancy and lactation, results in cardiac upregulation of RAGE at 3 and 6 months of age in the O-DR group (see Figure 4A). Recent data in the literature provides evidences that the overexpression of RAGE results in left ventricular cardiac hypertrophy, diastolic dysfunction, aortic valve stenosis (44). Aleshin and colleagues performed an ischemic-reperfusion experiment, using male mice genetically modified (RAGE^{-/-}), in this experimental protocol was observed that, knockout animals had smaller infarct area and higher contractility function when compared with wild type animals (45). Recent studies indicate a link between the oxidative stress and the activation of RAGE in models of ischemia-hyperfusion heart injury (46,47). Besides that, compelling evidences suggest that, RAGE and NAD(P)H oxidase (NOX) are involved in the pathogenesis of cardiac dysfunction (21). In our experimental model, maternal hyperglycemia not only induced increase of RAGE expression, bus also induced increase of NOX4 expression, the major component involved in the exacerbation of the oxidative stress in the heart, at 6 months of age (Figure 4B). Our data suggest that, upregulation of RAGE/NOX4 pathway, as involved in the cardiac impairment of the redox balance, cardiac hypertrophy and cardiac deposition of collagen.

Conclusion

Taken together, our results suggest that the exposure to maternal hyperglycemia promotes in the offspring heart, impairment of β -adrenergic signaling and enhanced of oxidative status.

References

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87:4-14.
2. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beaqley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 103(2):137-49.
3. Garcia-Touza M, Sowers JR. Evidence-based hypertension treatment in patients with diabetes. *J Clin Hypertens.* 2012; 14(2):97-102.
4. Acar E, Ural D, Bildirici U, Sahin T, Yilmaz I. Diabetic cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Dewq.* 2011; 11(8):732-7.
5. Giannetta, E., Isidori, A. M., Galea, N., Carbone, I., Mandosi, E., Vizza, C. D., et al. Chronic inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. *Circulation.* 2012; 125:2323–33.
6. Jiwani A, Marseille E, Lohse N, Damm P, Hod M, Kahn JG. Gestational diabetes mellitus: results from a survey of country prevalence and pactices. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2012; 25(6):600-10.
7. Barker DJP, Osmond, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 1986; 1(8489):1077-1081.
8. 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.
9. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci.* 1998; 95(2):115-28.

10. Capra L, Tezza G, Mazzei F, Boner AL. The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation. *Ital J Pediatr*. 2013; 23:39-47.
11. 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):2198-208.
12. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol*. 2015; 71:40-56.
13. Moridi H, Karimi J, Sheikh N, Goodarzi MT, Saidijam M, Yadegarazari R, et al. Resveratrol-Dependent Down-regulation of Receptor for Advanced Glycation End-products and Oxidative Stress in Kidney of Rats With Diabetes. *Int J Endocrinol Metab*. 2015; 13(2):e23542.
14. Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Pakdel FG, Khademvatani K. Cardioprotective effect of vitamin E: rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat. *J Diabetes Complications*. 2009; 23(5):310-6.
15. Hermann JE, Heale J, Bieraugel M, Ramos M, Fisher RL, Vickers AE. Isoproterenol effects evaluated in heart slices of human and rat in comparison to rat heart in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014; 274(2):302-12.
16. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (NOX4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107(35):15565-70.
17. Yan L, Bowman MAH. Chronic sustained inflammation links to left ventricular hypertrophy and aortic valve sclerosis: a new link between S100/RAGE and FGF23. *Inflamm Cell Signal*. 2014; 1(5).
18. Ma H, Li SY, Xu P, Babcock SA, Dolence EK, Brownlee M, et al. Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) up-regulation

contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(8B):1751-64.

19. Rani N, Bharti S, Bhatia J, Nag TC, Ray R, Arya DS. Chrysin, a PPAR- γ agonist improves myocardial injury in diabetic rats through inhibition AGE-RAGE mediated oxidative stress and inflammation. *Chemico-Biological Interactions*. 2016; 250:59-67.

20. Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt H, Drummond GR. NADPH oxidase in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition *Pharmacol Ther*. 2008; 120(3):254-91.

21. Koulis C, Watson AMD, Gray SP, Jandeleit-Dahm KA. Linking RAGE and Nox in diabetic micro- and macrovascular complications. *Diabetes & Metabolism*. 2015; 41:272-81.

22. Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflüger Archiv*. 1898; 61:291-332.

23. Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner EM. Role of ROS in ischemia induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010; 299(4):L535–41.

24. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1):131–8.

25. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247(10):3170–5.

26. Aebi H. Methods in enzymology. *Acta Chen*. 1984;105(1947):121–6. 51.

27. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214–26.

28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.

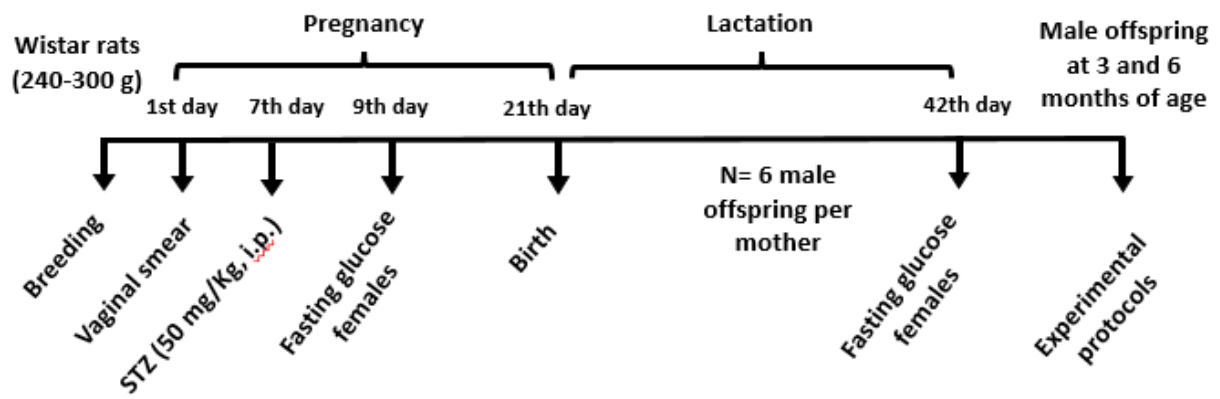
29. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11:447-55.
30. Hanson MA, Gluckman PD. Developmental Origins of Health and Disease - Global public health implications. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2015; 29:24-31.
31. Blondeau B, Joly B, Perret C, Prince S, Bruneval P, Lelièvre-Pégorier M, et al. Exposute in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. *Diabetes and Metab.* 2011;37(3):245-51.
32. Pasek RC, Gannon M. Advancements and challenges in generating accurate animal models of gestational diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(11):e1327-38.
33. Song Y, Li J, Zhao Y, Zhang Q, Liu Z, Li J, et al. Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. *Exp Diabetes Res.* 2012.
34. Okatan ES, Tuncay E, Hafez G, Turan B. Profiling of cardiac β -adrenoceptor subtypes in the cardiac left ventricle of rats with metabolic syndrome: Comparison with streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93:1-9.
35. Bilginoglu A, Seymen A, Tuncay E, Zeydanli E, Aydemir-koksoy A, Turan B. Antioxidants but not doxycycline treatments restore depressed beta-adrenergic responses of the heart in diabetic rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2009; 9:21-9.
36. Sellers DJ, Chess-Williams R. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the rat. *J Auton Pharmacol.* 2001; 21(1):15-21.
37. Dincer UD, Bidasee KR, Guner S, Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes.* 2001; 50(2):455-61.

38. Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One*. 2012; 7(11):e50593.
39. Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, Ritchie RH. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther*. 2014; 142(3):375-415.
40. Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, et al. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol*. 2005;18(10):1385-1396.
41. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): A medicinal chemistry perspective. *J.Med. Chem*. 2017.
42. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong, LL et al. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006; 185:70–77.
43. Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Implications for the Pathophysiology of Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2012; 9(2):107-116.
44. Yan L, Bowman MAH. Chronic sustained inflammation links to left ventricular hypertrophy and aortic valve sclerosis: a new link between S100/RAGE and FGF23. *Inflamm Cell Signal*. 2014; 1(5).
45. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W *et al*. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol*. 2008; 294:H1823–H1832.
46. Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthakrishnan R, Harja E, Lee LK, Hwang Y et al. Receptor for advanced glycation endproducts: Key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation*. 2006; 113:1226–1234.

47. Bucciarelli LG, Anathakrishnan R, Hwang YC, Kaneko M, Fei S, Sell DR *et al.* RAGE and the modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. *Diabetes*. 2008; 57:1941–1951.

Methodology

Figure 1. Experimental design for obtaining the animal model.



Results

Table 1. Parameters of the validation of the experimental model at the end of lactation: - female results.

Parameters	f-CR	f-DR
Weight (g)	280 ± 2,6	210 ± 11*
Glycaemia (mg/dL)	82 ± 2,1	460 ± 14 *

Values are means ± SEM. Student t test: $p < 0,05$. Legend: f-CR, female control rats; f-DR, female diabetic rats.

Table 2. Effects of maternal diabetes on the biometric parameters of offspring

	At birth		At 3 months		At 6 months	
Parameters	O-CR	O-DR	O-CR	O-DR	O-CR	O-DR
Weight (g)	6,5 ± 0,07	5,6 ± 0,2*	336,8 ± 7,8	267,8 ± 7,9*	406 ± 5,1	329,1 ± 7*
Length (cm)	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,05	38,8 ± 0,7	40,2 ± 0,2	44,5 ± 0,4	43,3 ± 0,9

Values are means ± SEM. One-way ANOVA: $p < 0,05$. Legend: O-CR, offspring of control rats; O-DR, offspring of diabetic rats.

Table 3. Effects of gestational diabetes on the biochemical profile of the adult offspring.

Parameters	At 3 months		At 6 months	
	O-CR	O-DR	O-CR	O-DR
Glucose	85 ± 1,3	95 ± 3,3	80 ± 1,8	94 ± 6,6
Triglyceride	51 ± 2,4	53 ± 2,7	45 ± 1,4	67 ± 5,9*
Total cholesterol	53 ± 2,0	50 ± 3,0	69 ± 1,2	66 ± 2,2
LDL-c	9,4 ± 1,5	17 ± 0,8 *	9,8 ± 1,4	26 ± 3,5 *
HDL-c	40 ± 1,4	29 ± 1,2*	35 ± 0,95	30 ± 1,0*

Values are means ± SEM. One-way ANOVA: p<0,05. Legend: O-CR, offspring of control rats; O-DR, offspring of diabetic rats; LDL-c, low density lipoprotein cholesterol; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol.

Table 4. Direct measurement of blood pressure of offspring at 6 months of age.

	O-CR6m	O-DR6m
SAP	110 ± 1,0	120 ± 1,6
DAP	81, ± 0,61	89 ± 2,4
MAP	90 ± 1,4	100 ± 2,0
HR	310 ± 3,5	330 ± 2,7*

Values are means ± SEM. n = 6 animals per experimental group. Student t-test: p<0,05.

Legend: O-CR, offspring of control rats; O-DR, offspring of diabetic rats; SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate.

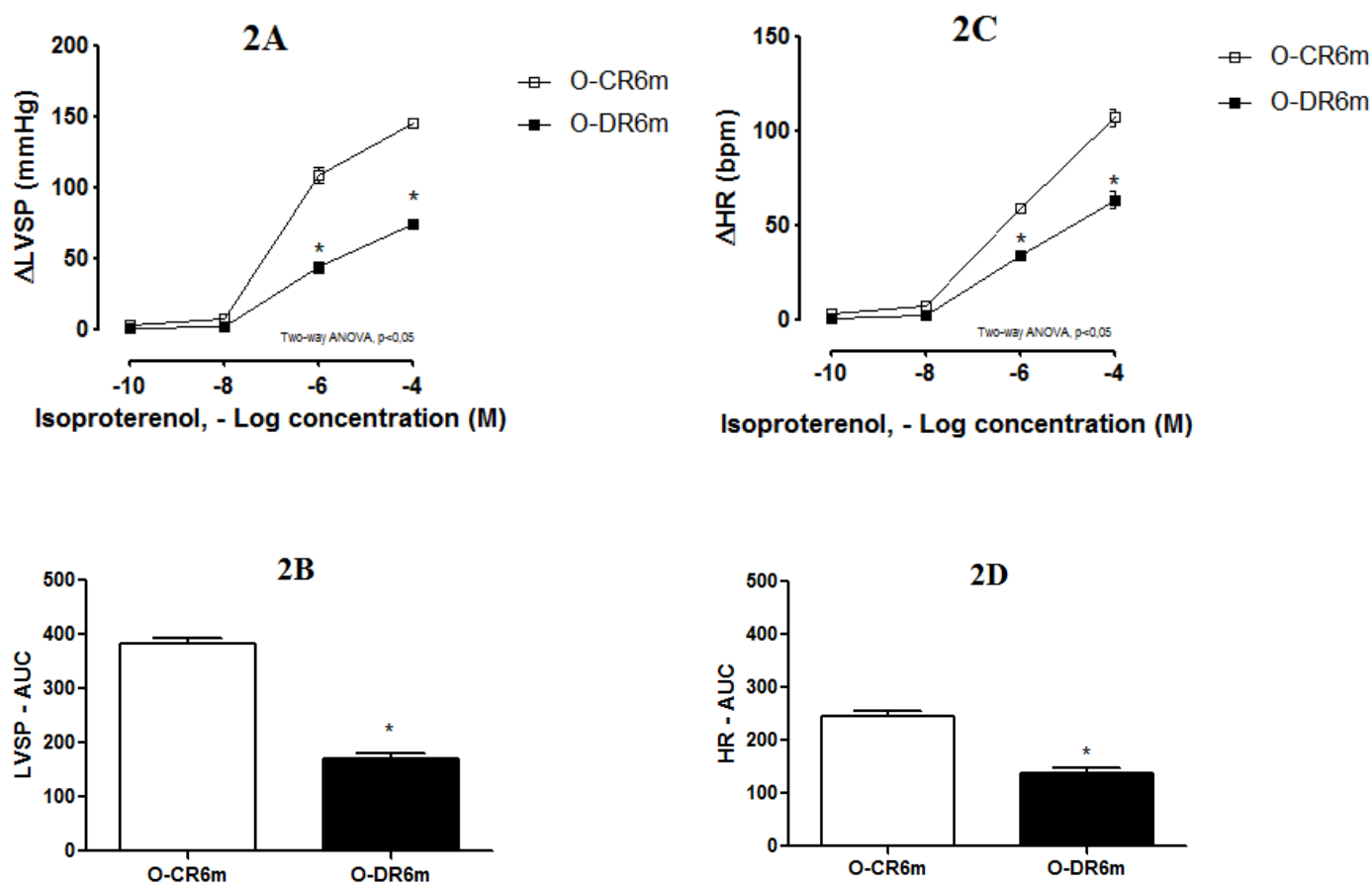


Figure 2. Left ventricular systolic pressure (LVSP, 2A) and heart rate (HR, 2C) curves obtained in the isolated perfused heart system. Figure 2B and 2D respectively represent the areas under the curve (AUC) of these parameters in the heart of offspring exposed to maternal hyperglycemia at 6 months of age. Values are means $\pm$ SEM, $n = 8$ per experimental group. Fig.2A and 2C, two-way ANOVA; post hoc: Bonferroni test: $p < 0.05$; Fig.2B and 2D, Student t-test: $p < 0.05$. Legend: O-CR, offspring of control rats; O-DR, offspring of diabetic rats.

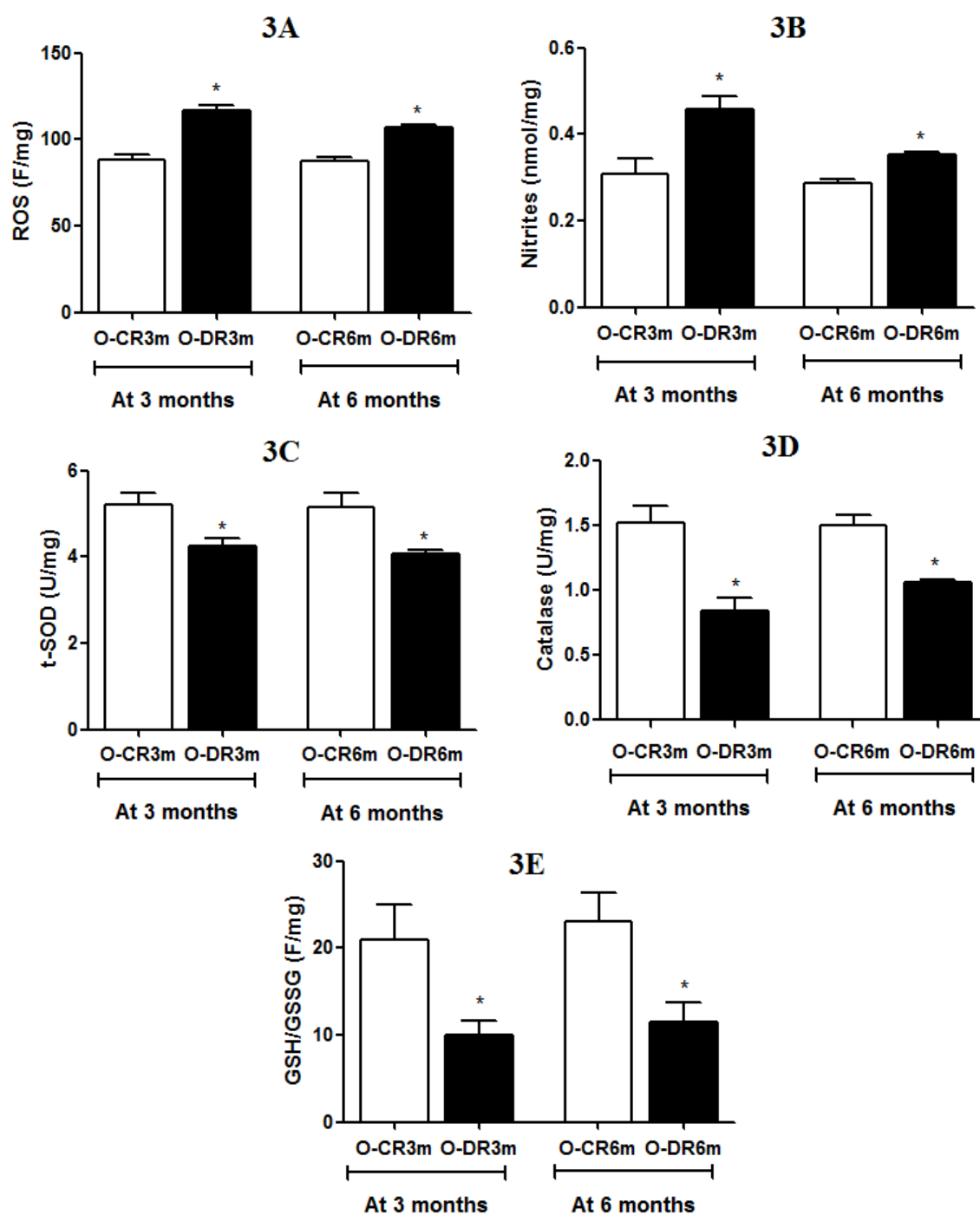


Figure 3. Analysis of cardiac oxidative stress in adult offspring at 3 and 6 months of age exposed to maternal hyperglycemia. Legend: ROS, reactive oxygen species; t-SOD, total activity of superoxide dismutase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione. n = 6 animals per experimental group; * p < 0,05 vs. O-CR (Student t test).

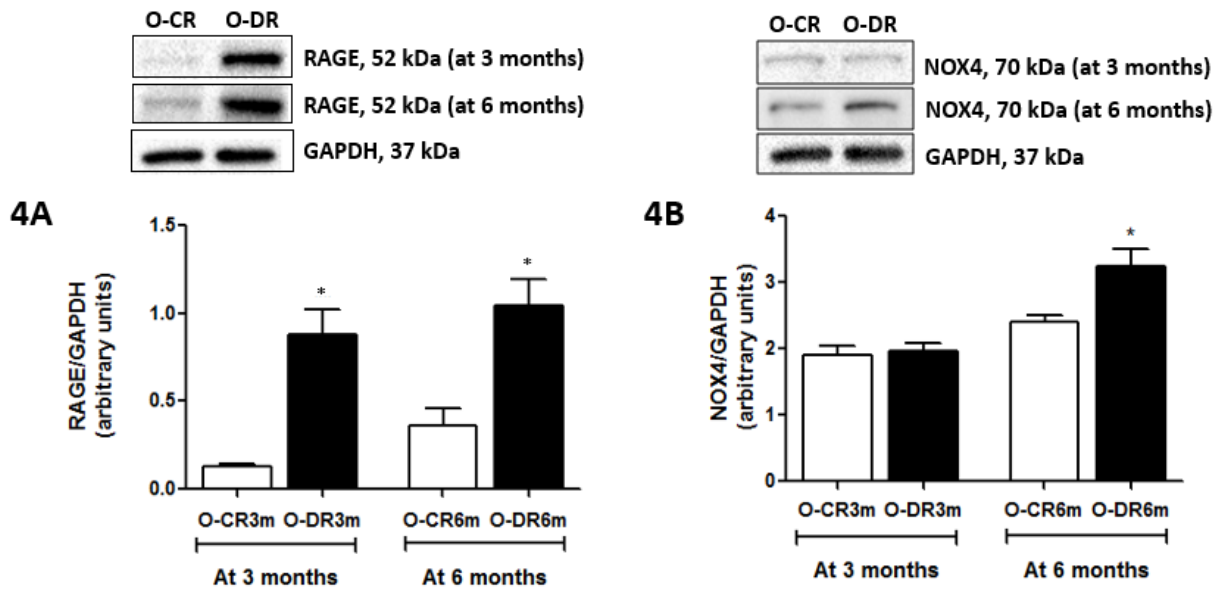


Figure 4. Western blot analysis of protein expression of RAGE (Fig.4A) and NOX4 (Fig.4B) in the heart at 3 and 6 months of age. $n = 4$ animals per experimental group, 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. O-CR (Student t test). Legend: O-CR, offspring of control rats; O-DR, offspring of diabetic rats; RAGE, receptor of advanced glycation end products; NOX4, NAD(P)H oxidase 4.

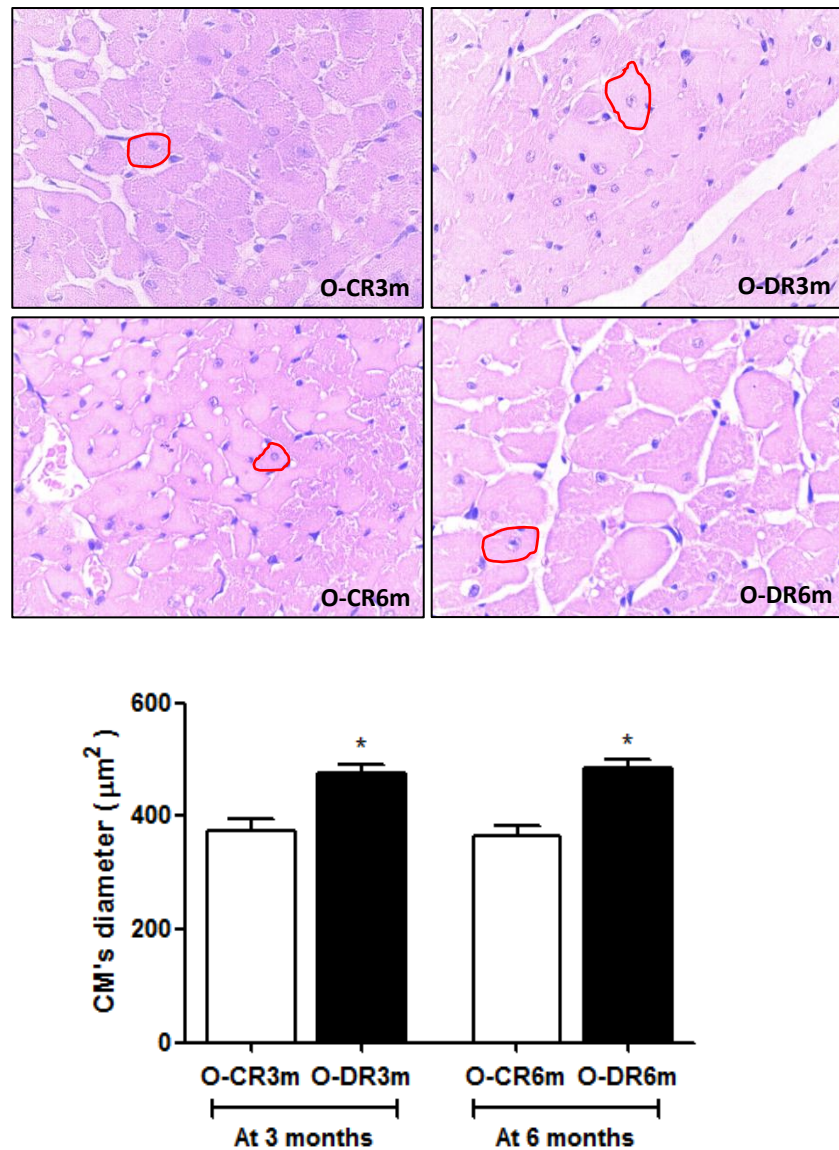


Figure 5. Photomicrograph of the heart of offspring exposed to maternal hyperglycemia at 3 and 6 months. Schematic model used to measure the index of cardiac hypertrophy (μm^2). H&E, 4 μm , 40x. n = 5 animals per experimental group; * $p < 0,05$ vs. O-CR group (Student t-test). Legend, CM's, cardiomyocytes.

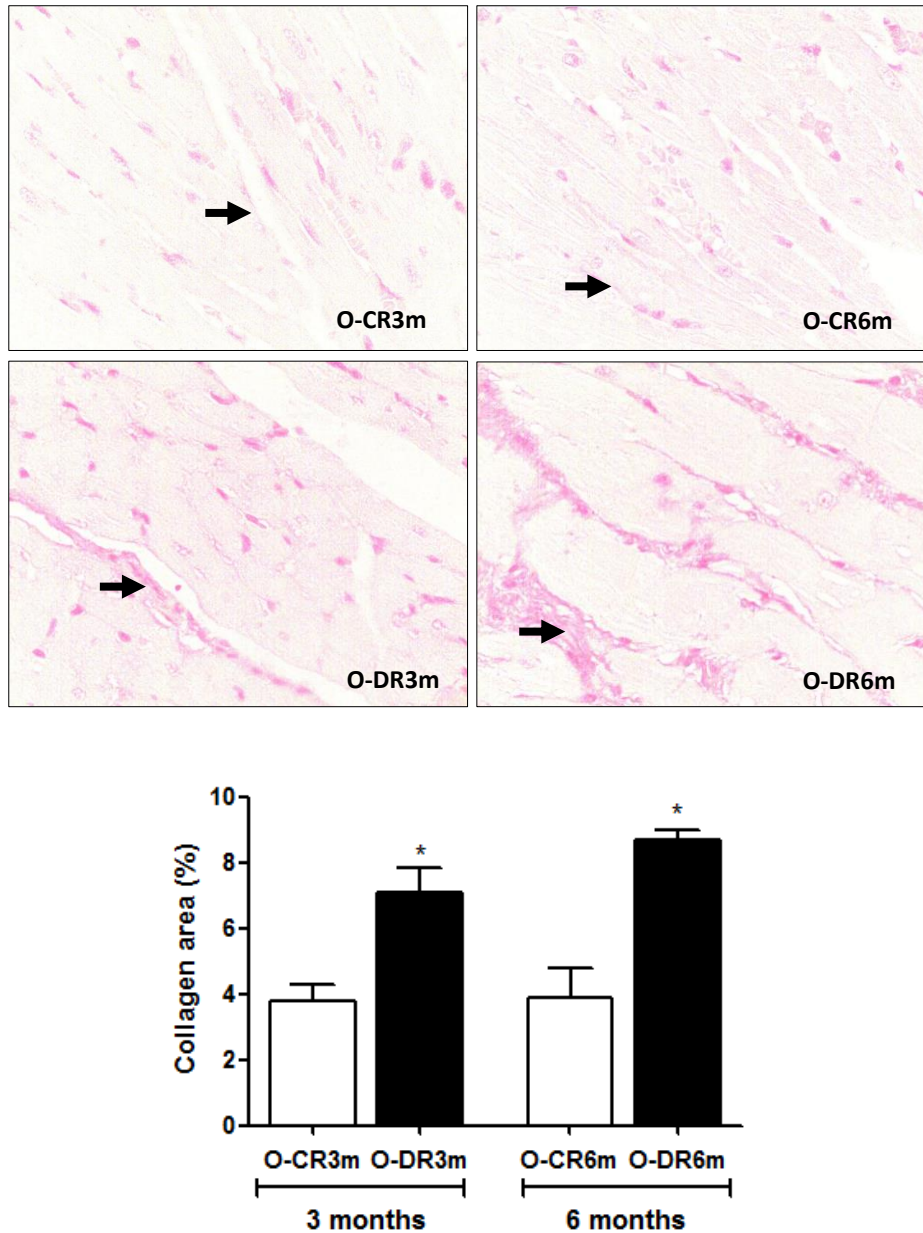


Figure 6. Photomicrograph of the heart of offspring exposed to maternal hyperglycemia at 3 and 6 months. Schematic model used to measure collagen levels in the cardiac tissue (%). Picrossirius Red, 4 μ m, 40x. n = 5 animals per experimental group; * p < 0,05 vs. O-CR group (Student t-test).

7. CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que as alterações ocorridas durante o período de gestação e lactação, em decorrência da presença de hipertrofia cardíaca e /ou diabetes, se reproduzem na prole, precipitando um quadro inflamatório que pode ser a gênese das alterações cardiometabólicas nos nossos modelos.