



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E**  
**FISIOLOGIA**

**Estudo das diferenças de gênero sobre a função vascular de ratos  
expostos à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina: papel do  
estrogênio**

**Francine lane Gomes de Sá**

**Recife – 2015**

FRANCINE IANE GOMES DE SÁ

**Estudo das diferenças de gênero sobre a função vascular de ratos  
expostos à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina: papel do  
estrogênio**

Tese submetida ao Programa de  
Bioquímica e Fisiologia da  
Universidade Federal de Pernambuco,  
para obtenção do grau de Doutor em  
Bioquímica e Fisiologia.

ORIENTADOR  
Fabiano Elias Xavier

RECIFE  
2015

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Liliane Campos Gonzaga de Noronha, CRB4-1702

S111e Sá, Francine lane Gomes de.  
Estudo das diferenças de gênero sobre a função vascular de ratos expostos à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina : papel do estrogênio / Francine lane Gomes de Sá. – Recife, 2015.  
133 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Fabiano Elias Xavier  
Tese (doutorado) – UFPE. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2015.  
Inclui referências.

1. Diabetes na gravidez. 2. Metabolismo 3. Hipertensão. 4. Feto. I. Xavier, Fabiano Elias. (Orientador). II. Título

618.3646 CDD (22.ed.) UFPE (BC2017)

**Francine lane Gomes de Sá**

“Estudo das diferenças de gênero sobre a função vascular de ratos expostos à hiperglicemia materna durante a vida perinatal: papel do estrogênio”

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

Aprovado por:

---

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier - Presidente

---

Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

---

Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

---

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes

---

Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira

Data: 30 / 07 / 2015

**“E aquele que tiver fé fará coisas que eu faço e ainda maiores”**

**A Deus, pelo dom da vida.  
Aos meus pais, pelo apoio e amor imensurável.**

## AGRADECIMENTOS

Esse é um trabalho que fecha um ciclo muito importante da minha vida. Foi uma jornada árdua, fruto de muito esforço e dedicação. Entretanto, só foi possível através da ajuda de algumas pessoas, cuja participação foi fundamental para o desenvolvimento desta tese e da minha própria formação. **Quero deixar aqui o meu profundo agradecimento.**

Agradeço a Deus, pela fé, proteção e força nos dias mais difíceis e também por toda orientação nessa jornada. Muito obrigada por colocar verdadeiros amigos durante esta caminhada. Pude perceber que eu sempre conseguia ajuda (divina) na hora que os problemas cruzavam meu caminho.

Aos meus pais por sempre acreditarem no meu potencial e nunca duvidarem disso. Através deste apoio incondicional, eu pude crescer, mesmo diante das dificuldades. Essa vitória só foi possível por toda confiança que vocês tiveram em mim.

Ao Professor Fabiano Elias pela orientação, confiança e oportunidade.

A professora Glória Duarte pelos ensinamentos diários.

Ao Professor Rubem Guedes, e sua aluna de doutorado Noranegge Accioly pelo excelente apoio técnico que recebi. Nora, muito obrigada por me ensinar várias técnicas e compartilhar comigo seus conhecimentos. Sem a sua ajuda e a do Prof. Rubem este trabalho não estaria tão bonito e tão completo.

Aos amigos que se tornaram especiais, Juliana Dantas, Juliana Rocha, Thayane Rebeca e Marcelo Rocha. Quero dizer que sou muito grata por ter vocês como companheiros de pesquisa e amigos! Obrigado pela paciência e perseverança nos momentos difíceis, quando batia aquele desânimo e tudo parecia perdido... A convivência no laboratório não seria a mesma sem vocês!

A Fernanda Elizabethe pela amizade e ajuda com alguns experimentos!

Aos amigos do LRV/LFFCV antigos e novatos: Jean, Fabiano Ferreira, Geórgia Leal, Geórgia Félix, Hicla Moreira, Odair Silva, Diego Barbosa, Jairo Teixeira, professora Cristina, Alex e aos ICs! Obrigado por tornarem melhor as longas horas passadas no laboratório.

Aos amigos da pós-graduação: Edjair, Valdilene, Léucio, Giselle, Sheila e Djanah, Ricielle, Alinny.

Meus primos queridos, Charlinny e Eduardo, também a minha linda sobrinha Maria Eduarda por trazerem tanta alegria para as nossas vidas.

Aos amigos de toda vida: Patrícia Lopes, Laise Carvalho, Priscila Pinto, Rafael Machado e Flávia Valéria. Obrigada por tantos anos de amizade e por sempre me apoiarem.

As minhas queridas roommates, Láis, Joana e Rubélia. brigada por tudo.

Aos amigos do LDPN: Janaína Campos, Tiago Araújo, Bianka Santana. Vocês são pessoas especiais que foram fundamentais em diversos momentos. À Caíque Fonseca por todos os ensinamentos. Você ficará pra sempre guardado em meu coração.

Ao técnico de laboratório José Antônio e a Veterinária Cláudia. Ao secretário de pós-graduação Djalma Silva pela paciência e disponibilidade e aos professores desta pós-graduação.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro).

## RESUMO

Durante a vida intrauterina, o feto é suscetível a mudanças do ambiente uterino que podem acarretar alterações fenotípicas na vida adulta. Se essas alterações advirem durante o período crítico de desenvolvimento fetal podem alterar a estrutura e função de órgãos e tecidos com consequências precoces e tardias. Sabe-se que o diabetes materno produz importantes alterações metabólicas na prole, tornando-os propensos ao surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta. Entretanto, quando se trata de indivíduos do sexo feminino, os efeitos da programação fetal sobre o sistema cardiovascular não são uniformes e tal fato pode ser atribuído a interferências hormonais. No presente estudo foram avaliadas possíveis diferenças relacionadas ao sexo sobre a função vascular de ratos submetidos ao diabetes materno e o efeito do estrogênio nestas possíveis diferenças. O diabetes materno foi induzido por estreptozotocina no 7º dia de gestação. Os animais foram divididos em prole controle (O-CR) e prole de ratas diabéticas (O-DR). Um grupo de animais do sexo feminino foi submetido à ovariectomia (OVX) e subdividido em tratado e não tratado com 17 $\beta$ -estradiol (OVX-E2). Ratos O-DR machos com 6 e 12 meses de idade apresentaram hipertensão em comparação ao grupo O-CR. Nenhum dos grupos O-DR fêmeas (3, 6 e 12 meses de idade) apresentaram mudanças da pressão arterial comparada ao grupo O-CR. Nem ovariectomia, nem o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol induziram modificações na pressão arterial de ratas O-DR ou O-CR. Apenas a aorta de ratos machos O-DR com 12 meses de idade apresentou redução do relaxamento à acetilcolina e aumento da contração à fenilefrina comparados ao O-CR de mesma idade. Em nenhuma das idades estudadas foram observadas mudanças da resposta vasodilatadora ou contrátil em aorta e artérias mesentéricas de resistência (AMR) de fêmeas O-DR comparadas ao grupo O-CR. As alterações observadas nas aortas do grupo O-DR machos foram revertidas na presença da superóxido dismutase (SOD) ou tempol. Efeito semelhante foi observado na presença de indometacina, NS-398, furegrelato ou SQ29548. A liberação de tromboxano A<sub>2</sub> e a geração de anions superóxido estavam aumentadas na aorta do grupo O-DR machos com 12 meses de idade. Diante da ausência de disfunção endotelial no grupo O-DR fêmea, este foi submetido à ovariectomia. Ratas O-DR-OVX apresentam redução no relaxamento à acetilcolina e hiperreatividade à noradrenalina/ fenilefrina na aorta e em AMR comparadas ao grupo O-CR-OVX. Estas modificações foram revertidas na presença de tempol ou apocinina. O tratamento com estrogênio nesses animais corrigiu o aumento da contração à noradrenalina (AMR) e fenilefrina (aorta), além da diminuição no vasorelaxamento à acetilcolina no grupo O-DR-OVX. No grupo O-DR-OVX-E<sub>2</sub>, nem o tempol, nem a apocinina induziram modificações no relaxamento à acetilcolina ou na contração à fenilefrina. Em conjunto, esses resultados demonstram que a exposição à hiperglicemia materna *in utero* afeta machos e fêmeas através de mecanismos distintos. Os animais do sexo feminino parecem ser protegidos dos efeitos vasculares da programação fetal induzida pela hiperglicemia materna. Esse efeito protetor parece ser devido à ação dos hormônios femininos, em especial o estrogênio, atuando como redutor do estresse oxidativo e melhorando a biodisponibilidade do óxido nítrico.

Palavras-chave: diabetes na gravidez. Metabolismo. Hipertensão. Feto.

## ABSTRACT

Exposure to maternal hyperglycemia induces hypertension and vascular dysfunction in adult male offspring. Because female offspring from several fetal programming are protected from the effects of fetal insult, in this study we analyzed possible differences relative to sex in blood pressure and vascular function in hyperglycemia-programmed offspring and the role of estrogen. Diabetes was induced on gestation day 7 (streptozotocin, 50mg.kg<sup>-1</sup>). Rats were divided into control offspring (O-CR) and offspring of diabetic rats (O-DR). A female group was subjected to ovariectomy (OVX) and divided into 17 $\beta$ -estradiol-treated (OVX-E<sub>2</sub>) and untreated group. Blood pressure, acetylcholine and phenylephrine/noradrenaline responses were analyzed in aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from 3-, 6- and 12-month-old male and female offspring. TxA<sub>2</sub> release was analyzed by commercial kits and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production by dihydroethidium-emitted fluorescence. Male but not female offspring of diabetic dams (O-DR) had increased blood pressure than controls (O-CR). Contraction to phenylephrine increased and relaxation to acetylcholine was decreased only in aorta from 12-month-old male O-DR than age-matched O-CR. Contractile and vasodilator responses were preserved in both aorta and MRA from female O-DR in all ages. Preincubation with tempol, superoxide dismutase, indomethacin, NS-398, furegrelate or SQ29548 decreased contraction to phenylephrine and potentiated relaxation to acetylcholine in 12-month-old male O-DR aorta. In this artery, TxA<sub>2</sub> release and O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation were greater in O-DR than O-CR. Neither ovariectomy nor 17 $\beta$ -estradiol produced changes on blood pressure in female O-CR or O-DR. However, the ovariectomy reduced the relaxation to acetylcholine and increased phenylephrine/ noradrenaline vasoconstriction in aorta and MRA, respectively, from O-DR. These changes were reversed by pretreatment of arteries with tempol or apocynin. Estrogen replacement in O-DR group reversed the hyperreactivity to norepinephrine (MRA) or phenylephrine (aorta) and the impaired relaxation to acetylcholine. In 17 $\beta$ -estradiol-treated ovariectomized O-DR nor tempol neither apocynin induced changes on acetylcholine, norepinephrine (MRA) and phenylephrine (aorta) responses. Taken together, these results demonstrate that exposure to maternal hyperglycemia *in utero* affects males and females differently. Female offspring seem to be protected from the programmed hypertension and the vascular dysfunction. This protective effect appears to be due to the action of the female hormones, especially estrogen, acting as an stress oxidative inhibitor and by enhancing the nitric oxide bioavailability.

Key-words: hyperglycaemia in prenat. Metabolism. Hypertension. Offspring.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Estrutura de uma grande artéria apresentada com as três camadas morfolologicamente distintas: a camada íntima, média e adventícia.

Figura 2: Síntese de NO a partir da L-arginina.

Figura 3: Representação esquemática dos efeitos relacionados à ativação da COX-1 e COX-2.

Figura 4: Componentes do sistema renina-angiotensina e suas interações.

Figura 5: Mecanismo de vasoconstrição e vasodilatação na célula saudável e no diabetes mellitus.

Figura 6: Produção de espécies reativas de oxigênio no diabetes.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|                               |                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| •O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Ânions superóxido                                         |
| •OH                           | Radical hidroxila                                         |
| A23187                        | Ionóforo de cálcio                                        |
| AA                            | Ácido araquidônico                                        |
| AAS                           | Ácido acetilsalicílico                                    |
| ADP                           | Adenina difosfato                                         |
| AMPc                          | Monofosfato cíclico de adenosina                          |
| Ang I                         | Angiotensina I                                            |
| Ang II                        | Angiotensina II                                           |
| Aro                           | Aromatases                                                |
| BH <sub>4</sub>               | Tetrahidrobiopterina                                      |
| CAT                           | Catalase                                                  |
| CNP                           | Peptídeo natriurético C                                   |
| COX-1                         | Ciclooxigenase-1                                          |
| COX-2                         | Ciclooxigenase-2                                          |
| Cu SOD                        | SOD cobre                                                 |
| DAG                           | Diacylglicerol                                            |
| DCV's                         | Doenças cardiovasculares                                  |
| E <sub>2</sub>                | 17-β-estradiol                                            |
| ECA                           | Enzima conversora de angiotensina                         |
| ECA-2                         | Enzima conversora de angiotensina 2                       |
| EDHF                          | Fator hiperpolarizante derivado do endotélio              |
| EETs                          | Ácido epoxieicosatrienoico                                |
| eNOS                          | Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase       |
| ET-1                          | Endotelina-1                                              |
| ET-2                          | Endotelina-2                                              |
| ET-3                          | Endotelina-3                                              |
| FAD                           | Flavina adenina dinucleotídeo                             |
| FMN                           | Flavina mononucleotídeo                                   |
| GMPc                          | 3'5'-monofosfato cíclico de guanosina                     |
| GPx                           | Glutathione peroxidase                                    |
| GTP                           | 5'-trifosfato de guanosina                                |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                                    |
| IADPSG                        | Associação Internacional de Grupos de Diabetes e Gestação |
| IBGE                          | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística           |
| IGF-1                         | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1         |
| iNOS                          | Isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase        |
| IP <sub>3</sub>               | 1, 4, 5 - inositol trifosfato                             |
| K <sup>+</sup>                | Íon potássio                                              |
| MLC                           | Cadeia leve da miosina                                    |
| MLCK                          | Cinase da cadeia leve da miosina                          |
| MnSOD                         | SOD manganês                                              |

|                                  |                                                   |
|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>NADPH</b>                     | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato        |
| <b>nNOS Tipo I</b>               | Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase |
| <b>NO</b>                        | Oxido nítrico                                     |
| <b>NOS</b>                       | óxido nítrico sintase                             |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Ânion superóxido                                  |
| <b>O<sub>2</sub></b>             | Oxigênio molecular                                |
| <b>OMS</b>                       | Organização Mundial de Saúde                      |
| <b>OONO<sup>-</sup></b>          | Peroxinitrito                                     |
| <b>PGD<sub>2</sub></b>           | Prostaglandina D <sub>2</sub>                     |
| <b>PGE<sub>2</sub></b>           | Prostaglandina E <sub>2</sub>                     |
| <b>PGF<sub>2α</sub></b>          | Prostaglandina F <sub>2α</sub>                    |
| <b>PGH<sub>2</sub></b>           | Prostaglandina H <sub>2</sub>                     |
| <b>PGI<sub>2</sub></b>           | Prostaciclina                                     |
| <b>PIP<sub>2</sub></b>           | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato                  |
| <b>PKA</b>                       | Proteína cinase A                                 |
| <b>PKG</b>                       | Proteína cinase G                                 |
| <b>PLA<sub>2</sub></b>           | Fosfolipase A <sub>2</sub>                        |
| <b>RA</b>                        | Receptor de androgênio                            |
| <b>RAAS</b>                      | Sistema Renina-angiotensina-aldosterona           |
| <b>RE</b>                        | Receptor de estrogênio                            |
| <b>REα-NR3A1</b>                 | Receptor de estrogênico α                         |
| <b>REβ - NR3A2</b>               | Receptor estrogênico β                            |
| <b>RG</b>                        | Receptor de glucocorticóides                      |
| <b>RM</b>                        | Receptor de mineralocorticoides                   |
| <b>RN</b>                        | Receptores nucleares                              |
| <b>ROCs</b>                      | Canais operados por receptores                    |
| <b>ROS</b>                       | Espécies Reativas de Oxigênio                     |
| <b>RP</b>                        | Receptor de progesterona                          |
| <b>SACs</b>                      | Canais ativados por estiramento                   |
| <b>SERCA</b>                     | Retículo sarcoplasmático                          |
| <b>SNS</b>                       | Sistema nervoso simpático                         |
| <b>SOCs</b>                      | Canais para cálcio operados por estoques          |
| <b>SOD</b>                       | Superóxido dismutase                              |
| <b>SRA</b>                       | Sistema renina angiotensina                       |
| <b>TxA<sub>2</sub></b>           | Tromboxano A <sub>2</sub>                         |
| <b>VOCs</b>                      | Canais para cálcio operados por voltagem          |
| <b>WHO</b>                       | World Health Organization                         |
| <b>ZnSOD</b>                     | SOD Zinco                                         |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                          |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                        | <b>13</b>  |
| <b>2</b> | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>                                                                                                             | <b>16</b>  |
| 2.1      | Programação Fetal                                                                                                                        | 16         |
| 2.2      | O sistema vascular                                                                                                                       | 21         |
| 2.2.1    | <i>Organização da parede vascular</i>                                                                                                    | 21         |
| 2.2.2    | <i>Tônus vascular e sua regulação através de fatores derivados do endotélio</i>                                                          | 22         |
| 2.3      | Fatores vasoativos derivados do endotélio                                                                                                | 25         |
| 2.3.1    | <i>Óxido nítrico</i>                                                                                                                     | 25         |
| 2.3.2    | <i>Prostaglandinas</i>                                                                                                                   | 27         |
| 2.3.3    | <i>Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)</i>                                                                               | 29         |
| 2.3.5    | <i>Endotelina</i>                                                                                                                        | 31         |
| 2.3.5    | <i>Angiotensina II</i>                                                                                                                   | 31         |
| 2.3.6    | <i>Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)</i>                                                                                               | 34         |
| 2.3      | Disfunção Endotelial e sua relação com o diabetes                                                                                        | 37         |
| 2.3.3    | <i>Hiperglicemia materna e a disfunção endotelial na prole</i>                                                                           | 39         |
| 2.4      | Hormônios sexuais                                                                                                                        | 41         |
| 2.5      | O estrogênio e a função cardiovascular                                                                                                   | 44         |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                         | <b>48</b>  |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                       | <b>49</b>  |
|          | <b>APÊNDICE A - Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2</b> | <b>80</b>  |
|          | <b>APÊNDICE B - Female hormones protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in offspring of diabetic rats</b>      | <b>99</b>  |
|          | <b>CONCLUSÕES</b>                                                                                                                        | <b>133</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente intrauterino e o feto estão sujeitos à influência de vários insultos que atingem a mãe durante a gravidez. Assim, o feto enquanto se desenvolve se torna completamente dependente dos nutrientes fornecidos pela mãe. Qualquer distúrbio no metabolismo materno pode alterar o fornecimento de nutrientes ao feto, o que pode desencadear adaptações estruturais e funcionais durante a gestação, com consequências duradouras para o crescimento e o metabolismo da prole na vida adulta. Este efeito, e suas consequências na prole, foram estudados por vários grupos de pesquisa, utilizando distintos modelos em que o metabolismo materno na gravidez foi experimentalmente manipulado. Um desses modelos é a exposição fetal à hiperglicemia durante a gestação, que pode ser correlacionada em alguns aspectos com o diabetes mellitus gestacional em humanos (Cottrell *et al.*, 2009; Catalano & Hauguel-De Mouzon, 2011).

Em nosso laboratório foram realizados estudos que demonstram que a prole de ratas diabéticas apresenta alterações da função vascular e hipertensão arterial na vida adulta, associadas a alterações metabólicas como, intolerância à glicose e resistência à insulina, as quais evoluem com o avanço da idade (Ramos-Alves *et al.*, 2012a). Estudos realizados por outros grupos têm obtido resultados semelhantes, demonstrando que filhos de mães diabéticas apresentam elevada incidência de resistência à insulina e obesidade na vida adulta (Blondeau *et al.*, 2011), fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes e de alterações sobre o sistema cardiovascular (West *et al.*, 2011; Mitanchez *et al.*, 2015). Entretanto, a maioria dos estudos utilizou animais do sexo masculino, fato que desperta o interesse por uma análise sobre o sexo feminino, uma vez que as diferenças hormonais entre sexos podem ser consideradas de grande relevância clínica, especialmente em relação à função cardiovascular.

No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde divulgada em 2013 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estimou que 6,2% da população brasileira têm diagnóstico clínico de diabetes; na região Nordeste esse percentual é de 5,4%. Considerando apenas a população feminina, este índice é de 7,0% em comparação aos 5,4% quando considerada a população do sexo masculino (IBGE, 2014). No tocante à idade, a mesma Pesquisa

Nacional de Saúde relatou que quanto maior a faixa etária, maior o percentual, que variou de 0,6% entre os indivíduos com idade entre 18 e 29 anos a 19,9% entre os indivíduos com idade entre 65 e 74 anos. Para aqueles que tinham 75 anos ou mais, o índice foi de 19,6% (IBGE, 2014). Corroborando com esses achados, as alterações hormonais decorrentes do declínio da função ovariana parecem influenciar de forma importante a patogênese e a manifestação clínica da diabetes, assim como as alterações a ela associadas (Tawfik *et al.*, 2015).

Ao estrógeno têm sido atribuídas várias propriedades cardioprotetoras resultantes de uma variedade de ações entre as quais incluem a modulação do metabolismo lipídico, a expressão de moléculas de adesão e o controle da migração de miócitos na parede vascular (Bush *et al.*, 1987). Em paralelo, o estrogênio também tem efeitos fisiológicos "não genômicos" que produzem vasodilatação pela ativação da sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) e da sintase de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), assim como participa da regulação do tônus vascular (Hermenegildo *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* revelam que o 17β-estradiol também apresenta efeito vasodilatador direto através da inibição dos canais para Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem nas células musculares lisas e diminui a contração induzida por vários agentes contráteis como, a vasopressina e a angiotensina II (Proudler *et al.*, 1995). Além disso, o estrógeno também apresenta efeito inibidor de processos oxidativos (Vina *et al.*, 2011). Alguns estudos têm demonstrado que a ovariectomia aumenta a liberação de prostanóides derivados da ciclooxigenase-2 (COX-2), e isto sugere que o efeito cardioprotetor deste hormônio também resulte em uma menor liberação destas substâncias, principalmente no sistema vascular (Martorell *et al.*, 2009). Uma maior expressão da COX-2 tem sido relacionada a diversos processos inflamatórios da parede vascular que resulta em disfunção endotelial e aumento do tônus arterial, o que podem contribuir para a patogênese de várias doenças cardiovasculares (Wong *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2013).

Em estudos prévios no nosso laboratório, foi evidenciado o envolvimento da via ácido araquidônico-ciclooxigenase-2 no aumento da resposta contrátil à estimulação alfa-adrenérgica em aorta, artéria mesentérica superior e em artérias mesentéricas de resistência estudadas em prole do sexo masculino de ratas diabéticas, bem como foi possível detectar que o prejuízo no relaxamento

dependente do endotélio induzido pela acetilcolina era devido à participação desses metabólitos originados da COX-2 (Ramos-Alves *et al.*, 2012c, a).

Os avanços experimentais em modelos animais e populacionais permitiram maior conhecimento sobre o efeito dos hormônios ovarianos na fisiopatogenia do diabetes. Todavia, estudos a cerca do desenvolvimento de disfunção endotelial, em função do sexo, relacionadas aos efeitos do diabetes materno na prole são controversos (Segar *et al.*, 2009). Uma vez que as fêmeas possuem um possível fator cardioprotetor através da atuação dos estrógenos, surge então a necessidade de investigar o efeito da exposição à hiperglicemia materna sobre a função vascular e metabólica da prole do sexo feminino, os possíveis mecanismos envolvidos bem como sua repercussão sobre a pressão arterial.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Programação fetal

Estudos epidemiológicos têm revelado a existência de uma forte associação entre as alterações do ambiente intrauterino e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hales *et al.*, 1991; Barker, 1995; 1998). Mesmo quando estas alterações ocorrem em um período de tempo relativamente curto, suas consequências podem se estabelecer por toda vida, causando na prole alterações na distribuição de alguns tipos celulares, no feedback hormonal, na atividade metabólica e em várias estruturas orgânicas. Estas alterações foram atribuídas às adaptações fetais que visam garantir o seu desenvolvimento. Porém, estas alterações podem alterar de forma permanente a estrutura e função de órgãos, tecidos e sistemas e assim predispor o indivíduo ao desenvolvimento de algumas doenças após o nascimento (Godfrey e Barker, 2001; Barker, 2004; Bateson *et al.*, 2004).

Na década de 1980, o médico e epidemiologista britânico David Barker e seus colaboradores propuseram que as doenças cardiovasculares e as desordens metabólicas poderiam ter origem nos primórdios do desenvolvimento fetal (Barker e Osmond, 1988; Barker *et al.*, 1989). Estes autores associaram o baixo peso ao nascimento com o desenvolvimento de várias doenças na vida adulta, tais como hipertensão arterial, doenças coronarianas, alterações no metabolismo do colesterol, aumento da resistência à insulina, além de desordens na função endócrina e imune (Osmond e Barker, 2000; Barker, 2002, 2004). Estas observações conduziram à “Hipótese de Barker” ou “Teoria da origem fetal das doenças do adulto” segundo a qual a nutrição deficiente durante a vida intrauterina e infância precoce origina uma adaptação metabólica e/ ou estrutural permanente que aumenta o risco de desenvolvimento de doença coronariana e outras doenças associadas, como a hipertensão arterial, o diabetes e o acidente vascular cerebral, na vida adulta – Programação Fetal (Barker, 1998). A Hipótese de Barker se baseia no conceito de plasticidade do desenvolvimento, que é a capacidade de um genótipo poder originar diferentes estados morfológicos ou fisiológicos em resposta a exposição a diferentes insultos durante o desenvolvimento (Pettitt *et al.*, 2010; Lawlor *et al.*, 2011). Essas adaptações se dariam na vida uterina, durante um

período de desenvolvimento conhecido como “período crítico”.

Embora inicialmente grande parte dos estudos tenha enfatizado o efeito da desnutrição materna sobre a “programação fetal” de algumas doenças na vida adulta (Godfrey e Barker, 2000), existem dados epidemiológicos e experimentais demonstrando que a exposição fetal a outras condições adversas, como a hiperglicemia materna (diabetes gestacional) tem contribuição importante para o aparecimento de doenças desde a vida intrauterina até a vida adulta (Mitanez *et al.*, 2014), tais como cardiomiopatias, diabetes tipo-2, dislipidemias, obesidade (Dabelea, 2007) e resistência à insulina (Kelstrup *et al.*, 2013), dentre outras doenças crônicas.

Com o passar dos anos, o conceito de diabetes gestacional foi modificado. Inicialmente era descrito como qualquer grau de intolerância à glicose reconhecida durante a gestação, que pode ou não vir a dissipar-se após o parto (Metzger, Coustan, 1998). Em 2010, esta definição foi revista e a Associação Internacional de Diabetes e o Grupo de Estudos Gestacionais definiram como qualquer grau de intolerância à glicose com o começo, ou inicialmente diagnosticada, durante a gestação, independente do uso de insulina ou da persistência após o parto (Metzger *et al.*, 2010). Para a Organização Mundial de Saúde (OMS) (*World Health Organization - WHO*), o diabetes gestacional inclui mulheres com diabetes e também aquelas que possuem hiperglicemia intermediária, com a presença de intolerância à glicose (IGT) e irregularidade da glicemia em jejum (IFG), conforme valores de referência para adultos e, recomenda-se que mulheres com a glicemia considerada severa sejam acompanhadas de forma diferenciada, com provável intervenção farmacológica (WHO, 2013).

O diagnóstico do diabetes na gravidez leva em consideração as diretrizes da OMS (2006) e é avaliado através de um ou mais dos seguintes parâmetros: glicose plasmática em jejum de 7,0 mmol/ L (126 mg/ dL), glicose no plasma de 11,1 mmol/ L (200 mg/ dL) após 2 horas de uma carga de glicose oral de 75g ou concentração plasmática aleatória de glicose maior ou igual a 11,1 mmol/ L (200 mg/dL), associado aos sintomas de diabetes (WHO, 2013). Já o diabetes mellitus gestacional é observado em qualquer momento da gravidez através de um ou mais dos seguintes critérios: glicose no plasma em jejum de 5,1-6,9 mmol/ L (92 -125 mg/ dL); glicose no plasma maior ou igual a

10,0 mmol/ L (180 mg/ dL) após 1h de glicose oral de 75g; glicose no plasma de 8,5-11,0 mmol/ L (153 -199 mg/ dL) após 2 horas na sequência da carga de glicose oral de 75g (WHO, 2013).

Apesar destes valores padronizados pela OMS, vários ensaios são encontrados na literatura e, para cada um deles, limiares distintos são recomendados por diferentes organizações profissionais. Atualmente não há consenso sobre a estratégia de diagnóstico ideal para o diabetes gestacional (Thompson *et al.*, 2013). Em 2010, a Associação Internacional de Grupos de Diabetes e Gestação - IADPSG decidiu criar novos limiares de análise para o diabetes gestacional. Os limiares de 75g para o teste de tolerância oral à glicose - OGTT usados para diagnóstico do diabetes gestacional foram glicemia de jejum entre 5,1 mmol/ L (92 mg/ dL) e 7,0 mmol/ L (126 mg/ dL) (Metzger *et al.*, 2010), enquanto que, mulheres que não exibiram complicações apresentaram níveis de glicemia entre 80-90 mg/ dL (Seabra *et al.*, 2015).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o momento inicial da exposição à hiperglicemia. O controle glicêmico rígido desde o início da gravidez reduz a prevalência de complicações, embora os mecanismos subjacentes a estas associações não estejam completamente compreendidos (Kitzmilller *et al.*, 2008). A existência prévia de diabetes ou o seu surgimento durante a gestação não possuem os mesmos efeitos sobre o desenvolvimento fetal e o mesmo resultado na prole em longo prazo. As complicações associadas com diabetes gestacional podem ser mais brandas se a hiperglicemia ocorreu no segundo ou terceiro trimestre de gravidez, entretanto mais graves se fetos foram expostos a elevados níveis glicêmicos durante toda a gestação (Casey *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 2001).

Assim, quando a mulher desenvolve o diabetes gestacional no primeiro semestre da gravidez, ocorre maior probabilidade de má formação fetal e, quando observada tardiamente na gestação eleva o risco de complicações metabólicas ao nascimento e macrosomia (Thompson *et al.*, 2013). Já mulheres que apresentam o diabetes tipo-1 trazem no início da gestação risco acentuado para problemas no embrião, tais como defeitos no tubo neural e no coração, enquanto que a exposição à hiperglicemia no terceiro semestre de gestação desencadeia a possibilidade de restrição no crescimento uterino, asfixia e morte fetal (Hay, 2012). Também foi relacionada com os níveis de

glicose elevados a ocorrência de parto Cesário e macrosomia, além de maiores riscos de lesão durante o parto, tais como distorcia no ombro, fraturas ósseas, asfixia e paralisia do nervo braquial (Bertino *et al.*, 2013).

Em nível mundial, a prevalência do diabetes gestacional é de cerca de 2 a 6 % e a estimativa é que em 2030 atinja os 10%. Destes nascidos, 40% serão obesos e mais de 90% terão diabetes do tipo 2. No entanto, estes dados podem modificar-se dependendo da população estudada. Além da etnia, outros fatores como idade, peso corporal, estilo de vida, dentre outros, podem influenciar os resultados obtidos (Catalano e Hauguel-De Mouzon, 2011). Em um estudo publicado em 2009, cerca de 4% da população caucasiana possuía diabetes gestacional. Valores bastante próximos foram encontrados em mulheres afro-americanas e hispânicas (3,5% e 3,6%, respectivamente), enquanto que mulheres asiáticas apresentaram valores mais elevados, cerca de 6% (Chu *et al.*, 2007). Em relação aos fatores de risco para o surgimento do diabetes gestacional observa-se que mulheres acima dos 35 anos, com sobrepeso ou obesidade, histórico de aborto e múltiplos partos cesáreo (Xiong *et al.*, 2001), assim como tabagistas (Anna *et al.*, 2008) e gemelaridade são mais susceptíveis. Ainda, nota-se uma relação inversa com a condição socioeconômica (Nerenberg *et al.*, 2014).

De fato, um dos fatores de risco que se destaca é a obesidade materna. Mulheres obesas têm até oito vezes mais riscos de desenvolver o diabetes gestacional quando comparadas às mulheres com peso normal (Chu *et al.*, 2007). Esta alteração repercute no feto e pode vir a contribuir para o sobrepeso e a obesidade já nos primeiros anos de vida (Simmons, 2011). Corroborando com estes dados, alguns estudos avaliaram a circunferência abdominal de crianças da idade pré-escolar à adolescência e identificaram uma correlação direta entre a maior circunferência abdominal e a exposição intrauterina ao diabetes gestacional. Como possível explicação, este resultado pode refletir uma forte influência do diabetes gestacional materno sobre o desenvolvimento de gordura corporal, demonstrando uma associação direta das concentrações de glicose materna durante a gestação com o excesso de massa adiposa na infância, possivelmente estimulada pelo aumento da exposição à insulina durante a vida intrauterina (Crume *et al.*, 2011; Gopinath *et al.*, 2011; Egeland *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de obesidade na vida futura da prole está relacionado com processos inflamatórios e resistência à insulina, uma vez que no diabetes mellitus gestacional, o tecido adiposo materno secreta agentes pró-inflamatórios, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$  (Ategbo *et al.*, 2006), o que irá diminuir a sensibilidade à insulina e favorecer o estado inflamatório (Cartier *et al.*, 2008). A leptina, outro agente pró-inflamatório, está relacionada com a patogênese do ganho de peso fetal e o desenvolvimento de bebês macrossômicos e seu efeito no cérebro, cria uma espécie de “memória metabólica” que irá programar tanto a obesidade como favorecer a síndrome metabólica na prole em idade adulta (Yessoufou e Moutairou, 2011).

A exposição à hiperglicemia materna não causa somente alterações no metabolismo da insulina, sua ação também foi avaliada sobre o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e observou-se que filhos de mães diabéticas possuíam concentrações plasmáticas elevadas deste fator, o que sugere que o excesso de nutrientes no momento da gestação pode ter implicações em longo prazo e que essas crianças podem desenvolver hipertensão quando adultos (Manderson *et al.*, 2002), uma vez que tanto a insulina quanto IGF-1 têm sido relacionados com o início da hipertensão essencial (Lever e Harrap, 1992).

Apesar dos avanços, filhos de mães diabéticas permanecem em risco para uma infinidade de complicações fisiológicas e congênitas no início da vida, tais como prematuridade, macrossomia, desconforto respiratório, hipoglicemia, hipocalcemia, hiperbilirrubinemia, policitemia, cardiomiopatia e algumas anomalias, particularmente do sistema nervoso central. Ademais, são predispostos a desenvolverem obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares na vida adulta. Os cuidados com esta população precisam se concentrar em garantir uma adaptação cardiorrespiratória adequada ao nascer, prevenção das possíveis lesões de nascimento e a manutenção do metabolismo da glicose em valores basais (Hay, 2012).

De acordo com o exposto anteriormente, segundo a literatura, filhos de mães diabéticas são mais susceptíveis a alterações cardiovasculares, com alterações a nível vascular, caracterizadas por um desbalanço entre os agentes reguladores do tônus vascular (vasoconstritores e vasodilatadores). Portanto, para o melhor entendimento dos efeitos e riscos da exposição fetal à

hiperglicemia materna sobre o sistema cardiovascular é essencial o conhecimento do endotélio vascular e das vias que participam do controle do tônus vascular.

## **2.2. O Sistema Vascular**

### **2.2.1 Organização da parede vascular**

Cada célula da parede vascular é capaz de responder a uma variedade de estímulos ambientais no espaço dinâmico desta parede. Estes estímulos podem ser de natureza física ou bioquímica e podem conduzir diversas alterações na função e no fenótipo destas células, tanto em condições fisiológicas quanto em estados patológicos. Nos vasos, as células estão rodeadas por uma complexa matriz extracelular altamente estruturada que consiste em grande parte de colágenos do tipo I e III, elastina e proteoglicanos (Stegemann *et al.*, 2005), os quais determinam as características mecânicas e estruturais da parede de veias e artérias (Pugsley e Tabrizchi, 2000).

Todas as células da parede vascular possuem funções que são reguladas por um conjunto de mecanismos existentes na própria parede, assim como entre a parede e o interstício ou entre a parede e o sangue. Estes mecanismos incluem: as interações célula-célula, as interações das células com os componentes da matriz extracelular, os fatores humorais, as condições químicas locais e as forças mecânicas. Os componentes da parede vascular estão dispostos em três camadas distintas, a saber: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia (Shadwick, 1999).

A túnica íntima é composta por uma camada de células endoteliais longitudinalmente arranjadas ao longo do eixo axial do vaso e na direção do fluxo sanguíneo, uma camada subendotelial e uma membrana basal (FIGURA1). Esta última é composta de colágeno, elastina, fibronectina, laminina e proteoglicanos. A membrana basal está em íntimo contato com a lâmina elástica interna que é formada por uma malha compacta de elastina (Wagenseil e Mecham, 2009).

A túnica ou camada média é constituída de células musculares lisas, as quais se encontram circunferencialmente arranjadas ao longo do eixo do vaso, e de uma matriz extracelular que inclui lâminas de fibras elásticas, fibras

colágenas e proteoglicanos. Esta camada está limitada exteriormente pela lâmina elástica externa e internamente pela lâmina elástica interna. A camada situada externamente à lâmina elástica externa, a túnica adventícia, é constituída de tecido conjuntivo, contendo fibras de colágeno, fibras elásticas e componentes celulares como fibroblastos e mastócitos. Esta camada se prolonga gradualmente relacionando-se com estruturas vizinhas. Nesta camada perivascular encontra-se uma rede de vasos de calibre muito pequeno conhecido como *vasa vasorum*, cuja função está relacionada com o metabolismo da parede vascular. Na camada adventícia também pode ser encontrada uma rede de fibras nervosas relacionadas com a inervação simpática (Pugsley e Tabrizchi, 2000; Hillebrands *et al.*, 2001).

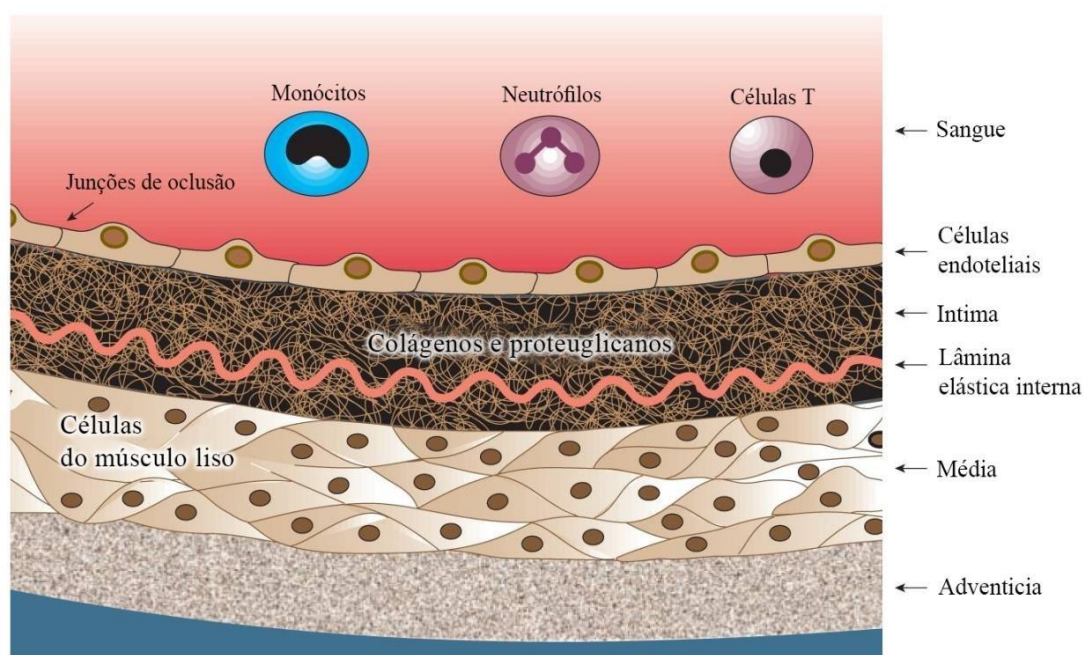


Figura 1: Estrutura de uma grande artéria apresentada com as três camadas morfológicas distintas: a camada íntima, média e adventícia. (Adaptado de Lusis, 2000)

### **2.2.2 Tônus vascular e sua regulação através de fatores derivados do endotélio**

O controle do tônus vascular é um evento importante na regulação do fluxo sanguíneo tecidual e da pressão arterial. Seu mecanismo é complexo e envolve a participação de agentes vasoativos de origem sistêmica (sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, etc), nervosa (sistema nervoso simpático e inervação perivascular) e local (endotélio e células musculares

lisas) (Burnstock e Ralevic, 1994; Vanhoutte, 2000).

O endotélio representa uma única camada de células que reveste todos os vasos do corpo, incluindo as artérias, veias, arteríolas, vênulas e capilares (Vane *et al.*, 1990). Em virtude de seu contato direto com o sangue circulante, o endotélio representa uma interface importante entre o sangue e o tecido subjacente. A função destas células é ampla e pode variar de acordo com a sua localização (Hahn e Schwartz, 2009). Nos vasos de condutância, que incluem as artérias de maior calibre, como a aorta, as artérias carótidas, as artérias coronárias, braquiais e femorais, o endotélio saudável proporciona uma superfície uniforme, que limita a ativação dos fatores de coagulação e de inflamação (Berk *et al.*, 2001), bloqueia a transferência de partículas lipídicas aterogênicas para dentro da parede arterial (Gimbrone, 1999), inibe a expressão de fatores quimiotáticos e a liberação de citocinas, controla o crescimento da parede vascular e impede a agregação e a adesão de plaquetas (Caballero *et al.*, 1999; De Vriese *et al.*, 2000; Cersosimo e DeFronzo, 2006). Nos vasos de resistência, as células endoteliais ajudam a regular o fluxo sanguíneo, a resistência periférica total e a pressão arterial sistêmica, enquanto que nas arteríolas pré-capilares desempenham um papel no transporte e distribuição de nutrientes e hormônios, incluindo glicose, gordura e insulina e a destinação adequada de resíduos do metabolismo (Caballero *et al.*, 1999; Balletshofer *et al.*, 2000; Makimattila, Yki-Jarvinen, 2002; Chobanian *et al.*, 2003; Cersosimo e DeFronzo, 2006).

A função primordial do endotélio vascular é, portanto, a formação de uma barreira eficaz para fluidos, proteínas e células, enquanto permite/ regula a difusão eficaz de gases, o transporte de solutos e o tráfego de células inflamatórias (Hewett e Murray, 1993). O endotélio permite a difusão passiva de substâncias de baixo peso molecular (raio  $<3$  nm), tais como gases e íons, enquanto controla de forma dinâmica o transporte transendotelial de proteínas plasmáticas, como a albumina ou imunoglobulinas (variação de raio: 7-11,5 nm). Qualquer falha nesta barreira resulta em extravasamento de solutos, proteínas e água para o interstício (Nickles e Kuebler, 2010). Além da sua atuação na homeostase sistêmica, as células endoteliais possuem importante papel na regulação do tônus do músculo liso vascular através do balanço na produção e liberação de substâncias vasoativas (vasoconstritoras e

vasodilatadoras), que irão modular o estado contrátil das células do músculo liso vascular (Vita, 2011).

Entre os fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio pode-se citar: o óxido nítrico (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987), a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) (Moncada *et al.*, 1977; Vanhoutte, 1993) e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (Feletou e Vanhoutte, 1988; Taylor, Weston, 1988). O endotélio produz ainda substâncias vasoconstritoras como, a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988), a angiotensina II (Kifor e Dzau, 1987), os ânions superóxido (Majzunova *et al.*, 2013) e os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ), as prostaglandinas ( $\text{E}_2$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{F}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGH}_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), respectivamente (Frolich e Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993).

O endotélio produz alterações no lúmen arterial, sobretudo através de modificações estruturais ou no equilíbrio entre os fatores vasoconstrictores e vasodilatadores por ele liberados. Essas alterações repercutem no tônus do músculo liso vascular e, como consequência, na regulação do fluxo sanguíneo e da resistência vascular (Avogaro *et al.*, 2011). O tônus do músculo liso vascular é ainda influenciado por estímulos mecânicos da parede vascular (p.ex. pressão transmural) e por estímulos nervosos e hormonais (Deussen *et al.*, 2006). Estes estímulos induzem mudanças no potencial de repouso da membrana, provocados por disparos de potenciais de ação ou por ativação de canais iônicos (Horowitz *et al.*, 1996).

A contração das células musculares lisas da parede vascular é ativada pelo complexo calcio-calmodulina, formado a partir do aumento na concentração de cálcio citoplasmático, resultante do influxo a partir do meio extracelular ou de sua liberação do retículo sarcoplasmático (Kim *et al.*, 2008). O influxo de cálcio do meio extracelular ocorre através da abertura de canais específicos da membrana citoplasmática, (Lincoln *et al.*, 2001), tais como os canais para cálcio operados por receptores (ROCs), os canais para cálcio operados por voltagem (VOCs), os canais para cálcio operados por estoques (SOCs) e canais para cálcio ativados por estiramento (SACs) ou através do modo reverso do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . (Kim *et al.*, 2008; Blaustein e Hamlyn, 2010). O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina então formado induz ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), resultando em fosforilação da cadeia leve

da miosina (MLC20), aumento da atividade ATPase da miosina e em contração muscular (Gao *et al.*, 2001). Substâncias como a noradrenalina, a endotelina-1, a angiotensina II e a fenilefrina atuam sobre a musculatura lisa através de receptores específicos na membrana plasmática. A ligação destas substâncias ao seu receptor ativa a proteína G, que corresponde a um complexo proteico composto por três subunidades  $\alpha$  (subunidade catalítica)  $\beta$  e  $\gamma$ , levando à estimulação da fosfolipase C, a qual é responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) em inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG) (Siegel, 1996). O  $\text{IP}_3$  liga-se a um receptor específico na membrana do retículo sarcoplasmático e estimula a liberação do cálcio ali armazenado, já o DAG ativa a PKC, que é uma enzima com efeitos importantes na célula muscular lisa, como fosforilação da cadeia leve da miosina e aumento da mobilização do cálcio através do sarcolema (Siegel, 1996). A ligação destas substâncias ao seu receptor resulta ainda em abertura de VOCs e ROCs, produzindo influxo de cálcio do meio extracelular (Horowitz *et al.*, 1996).

## **2.3 Fatores vasoativos derivados do endotélio**

### **2.3.1 Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO) é o mais importante vasodilatador de origem endotelial. Ele desempenha importantes funções em praticamente todos os órgãos e tecidos no organismo. Ele atua como mediador da resposta imune, como neurotransmissor, como molécula citotóxica, como anti-agregante plaquetário, como regulador do crescimento da parede vascular, etc. A descoberta do NO proporcionou um grande avanço em diversas áreas de pesquisa no âmbito da fisiologia, farmacologia, imunologia, patologia e neurociências (Alderton *et al.*, 2001).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina através da reação catalisada pela enzima sintase de NO (NOS) (FIGURA 2). Esta enzima está expressa em vários tecidos do organismo em três isoformas distintas: a isoforma neuronal ou nNOS (Tipo I) encontrada principalmente tecidos nervosos, a isoforma endotelial ou eNOS (tipo III), encontrada principalmente no endotélio vascular e a isoforma induzível ou iNOS (tipo II), a qual foi originalmente identificada como sendo induzida por citocinas inflamatórias, a

qual pode ser expressa em macrófagos e outros tipos celulares de vários tecidos do organismo. As isoformas nNOS e eNOS, ambas constitutivas, são dependentes do complexo cálcio-calmodulina para sua ativação, enquanto que a iNOS produz NO de forma independente deste complexo, e é induzida apenas quando estimulado por endotoxinas bacterianas ou certas citocinas pró-inflamatórias (Tsutsui *et al.*, 2015). Cada isoforma é codificada por diferentes genes e possuem propriedades moleculares, catalíticas e imunológicas diferentes (Marletta, 1993; Wu *et al.*, 2002). A reação de síntese do NO depende ainda de alguns co-fatores, como: a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NADPH), a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Li e Poulos, 2005).

Uma variedade de estímulos (físicos ou químicos), tais como, a acetilcolina, a bradicinina, o ionóforo de cálcio (A23187), a trombina, a substância P, a adenina difosfato (ADP), o estresse de cisalhamento (*shear stress*) e a agregação plaquetária são capazes de induzir a síntese e liberação de NO pelas células endoteliais (Palmer *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988; Moncada *et al.*, 1991). Estes estímulos promovem aumento dos níveis de cálcio nas células endoteliais, levando à formação do complexo cálcio-calmodulina (Rapoport e Murad, 1983). Isto induz a atividade da eNOS com consequente formação de NO. O NO é liberado e se difunde para a camada média da parede arterial, onde induz ativação da guanilato ciclase solúvel das células musculares lisas. Isto resulta na conversão do 3'5'-trifosfato de guanosina (GTP) em 3'5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Bolotina *et al.*, 1994). No músculo liso vascular o GMPc atua através da ativação de uma proteína cinase dependente de GMPc (PKG) que leva à fosforilação de várias proteínas, resultando na redução da concentração intracelular de cálcio e da sensibilidade das proteínas contráteis a esse íon, induzindo vasorrelaxamento (Hisamoto *et al.*, 2001).

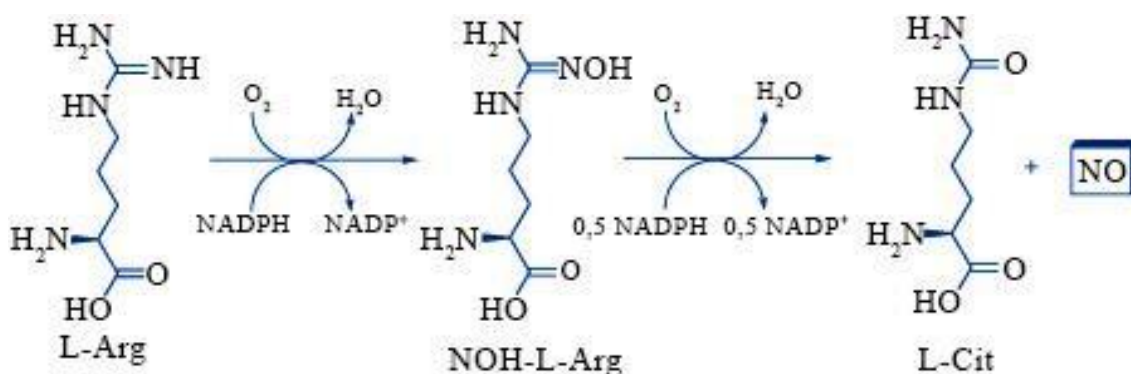


Figura 2: Síntese de NO a partir da L-arginina. Fonte: Daff, 2010

A PKG promove hiperpolarização e relaxamento das células musculares lisas através da ativação de canais para potássio dependentes de cálcio, que resulta em inibição da entrada de cálcio do meio extracelular através de canais dependentes de voltagem (White *et al.*, 1995). Estes últimos se fosforilados pela PKG acarretará diminuição do influxo extracelular de cálcio. A PKG ativa ainda as Ca<sup>2+</sup>-ATPases da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático (SERCA) o que leva à redução da concentração intracelular de cálcio (Carvajal *et al.*, 2000). Portanto, o NO está envolvido na regulação do tônus vascular e da resistência periférica, contribuindo assim, para o controle da pressão arterial. Ainda, atua na modulação da contratilidade cardíaca, em mecanismos anti-ateroscleróticos, inibe a agregação plaquetária, a adesão de células sanguíneas na parede vascular e previne a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas, o qual estimula a proliferação de células musculares lisas. Estas ações contribuem para redução da trombose e do recrutamento de leucócitos, além de outras ações vasoprotetoras (Naseem, 2005).

### 2.3.2 Prostaglandinas

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA), sendo este um derivado dos fosfolípidios de membrana, liberado por ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Uma vez liberado, o AA é oxidado pela ciclooxygenase (COX), enzima chave na síntese de prostaglandinas, e convertido a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), precursora das demais prostaglandinas (Bos *et al.*, 2004). A formação do AA se dá em resposta a múltiplos estímulos em vários tipos de células. Em decorrência da curta meia-vida que possuem, quando

sintetizadas as prostaglandinas são liberadas imediatamente e exercem sua ação sobre as células adjacentes na qualidade de autacóides e mediadores lipídicos parácrinos (Bos *et al.*, 2004).

Existem algumas prostaglandinas funcionalmente importantes, como: a prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ), também chamada de prostaciclina, a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), a prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ), a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e o tromboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ), agindo através de subtipos de receptores específicos na membrana, como: os receptores para  $PGE_2$  (receptores EP), expressos na forma de subtipos 1 ( $EP_1$ ), 2 ( $EP_2$ ), 3 ( $EP_3$ ) e 4 ( $EP_4$ ); o receptor para  $PGI_2$  (receptor IP); os receptores para  $PGD_2$  (receptores DP), subtipos 1 ( $DP_1$ ) e 2 ( $DP_2$ ); receptores para  $TxA_2$  (receptores TP) e receptores  $PGF_{2\alpha}$  (receptor FP) (Narumiya *et al.*, 1999).

Quando os receptores IP,  $DP_1$ ,  $EP_2$  e  $EP_4$  são ativados, ocorre aumento da concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e relaxamento da musculatura lisa (Negishi *et al.*, 1995; Narumiya *et al.*, 1999). Enquanto que a ativação dos receptores  $EP_1$ , FP e TP induz ativação da fosfolipase C, levando à formação de  $IP_3$  e DAG, aumento da concentração intracelular de cálcio e contração do músculo liso. Já a ativação dos receptores  $EP_3$  induz contração através da diminuição da formação de AMPc (Negishi *et al.*, 1995; Narumiya *et al.*, 1999; Jadhav *et al.*, 2004).

A  $PGI_2$  é a principal prostaglandina endotelial e age principalmente na agregação plaquetária e na musculatura lisa vascular, induzindo relaxamento. Entretanto, tem sido demonstrado que a  $PGI_2$  é capaz também de induzir vasoconstrição, a qual é mediada através da ativação de receptores TP (Gluais *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2010)

Foram identificadas duas isoformas da COX: a COX-1 e a COX-2. A primeira é expressa constitutivamente em uma variedade de células e tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins) e está relacionada a diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, regulação da agregação plaquetária e regulação do fluxo sanguíneo renal (Smith *et al.*, 1996). A outra isoforma, a COX-2, é produto de um gene de resposta precoce em células inflamatórias, por isso denominada de enzima induzível (FIGURA 3). A expressão da COX-2 é induzida por endotoxinas bacterianas ou citocinas,

como a IL-1 e 2 e o TNF $\alpha$  (Antman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). No cérebro, a COX-2 pode ser expressa constitutivamente; sua expressão basal parece ser regulada pela atividade sináptica durante o desenvolvimento. Atua na mediação central da dor e da febre e pode ter sua expressão inibida por glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-14 (Dubois *et al.*, 1998; Morita, 2002).

Além da participação das prostaglandinas na manutenção de várias funções fisiológicas, atualmente é bem conhecida a implicação destes mediadores em vários processos patológicos que cursam com ativação de processos inflamatórios, como nas enfermidades cardiovasculares e renais (Vane *et al.*, 1994; Schonbeck *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005). Em modelos experimentais de hipertensão foi demonstrada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular à fenilefrina (Alvarez *et al.*, 2005). Corroborando esses achados, indivíduos hipertensos apresentaram melhora na dilatação dos vasos de resistência do antebraço quando utilizado um inibidor não seletivo da COX, a indometacina (Taddei *et al.*, 1997), bem como quando foi utilizado o ácido acetilsalicílico (AAS) (Campia *et al.*, 2002) ou o inibidor seletivo da COX-2, o fármaco Celecoxibe (Widlansky *et al.*, 2003). Também em modelos animais, como em ratos SHR, é observado aumento da produção de prostaglandinas e maior contração mediada por estimulação dos receptores TP. Estas alterações podem ser revertidas quando utilizados antagonistas dos receptores TP e inibidores da COX (Luscher *et al.*, 1990; Vanhoutte *et al.*, 2009).

### **2.3.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)**

O EDHF foi descrito pela primeira vez há cerca de 20 anos (Bolton *et al.*, 1984). Estudos posteriores apontaram que este fator foi responsável pela resposta vasodilatadora quando as ações do NO e da PGI<sub>2</sub> foram bloqueados (Chen *et al.*, 1988; Taylor, Weston, 1988). O EDHF é descrito como um vasodilatador em artérias e veias, produzido e liberado pelo endotélio frente a diversos estímulos e é indutor de hiperpolarização de grande amplitude. A contribuição do EDHF para o relaxamento dependente do endotélio é significativamente maior em vasos de pequeno calibre em comparação aos de maior calibre (Kang, 2014).

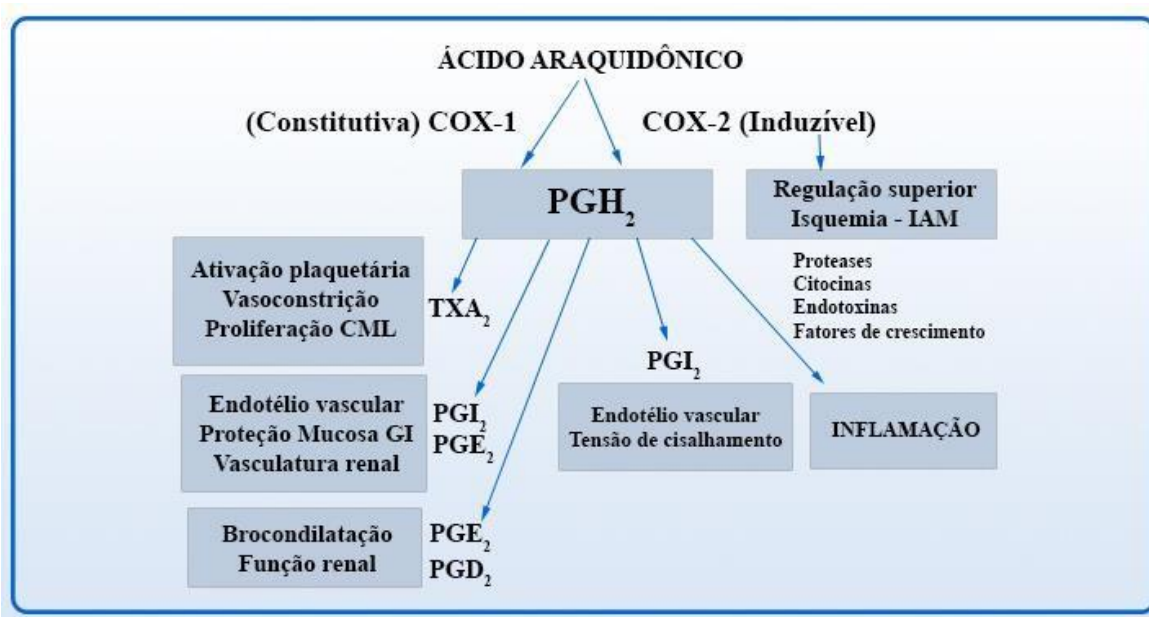


Figura 3: Representação esquemática dos efeitos relacionados à ativação da COX-1 e COX-2. COX - ciclooxigenase; PG - prostaglandina; TX - tromboxano; IAM - infarto agudo do miocárdio. Fonte: Batlouni, 2010.

Apesar dos numerosos estudos existentes sobre o tema, a identificação química do EDHF ainda é desconhecida. Diferentes fatores têm sido apontados como EDHF, tais como: o íon potássio ( $K^+$ ), os derivados do ácido epoxieicosatrienóico (EETs), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o peptídeo natriurético C (CNP), assim como mecanismos não difusíveis mediados pelo acoplamento elétrico via junções comunicantes mioendoteliais (Fitzgerald *et al.*, 2005).

Em situações patológicas, tais como diabetes, a atividade do EDHF encontra-se alterada, principalmente em artérias de pequeno calibre. Estudos realizados em camundongos diabéticos sugerem uma diminuição na resposta mediada por EDHF, o que demonstra seu papel em contribuir para complicações microvasculares observadas nestas condições (Pannirselvam *et al.*, 2002; Fitzgerald *et al.*, 2005). Diferentes modelos de diabetes (tipo I e II) apresentam atividade vasorrelaxante reduzida do EDHF (De Vriese *et al.*, 2000; Oniki *et al.*, 2006), tanto em artérias de resistência, como as artérias do leito mesentérico, como em artérias de condutância, como as carótidas e a artéria renal (Fukao *et al.*, 1997; De Vriese *et al.*, 2000; Nakazawa *et al.*, 2007).

### **2.3.4 Endotelina**

A endotelina corresponde a uma família de peptídeos que compreende a endotelina-1 (ET-1), a endotelina-2 (ET-2) e a endotelina-3 (ET-3), cada uma contendo 21 aminoácidos (Inoue *et al.*, 1989). ET-1 é um peptídeo secretado principalmente pelo endotélio vascular (Yanagisawa *et al.*, 1988), é o agente vasoconstritor mais potente conhecido. As respostas vasculares à ET-1 são mediadas através dos dois subtipos de receptores, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990), ambos localizados nas células do músculo liso vascular e associados com a vasoconstrição. O receptor ET<sub>B</sub> também está localizado nas células endoteliais e relacionam-se com a vasodilatação, estimulando a liberação de NO e prostaciclina (Miyagawa e Emoto, 2014).

A ET-1 não é apenas um peptídeo vasoconstritor; ela é uma citocina multifuncional com numerosas atividades que afetam todos os níveis da função celular (Krämer *et al.*, 1992; Barton e Kiowski, 2001), com propriedades inotrópicas, quimiotáticas e mitogênicas. Estas funções incluem o desenvolvimento embrionário, o equilíbrio hidroeletrolítico (através dos seus efeitos sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina e peptídeo natriurético atrial), nocicepção e funções neuronais, entre outros. Ademais, as propriedades celulares da ET-1 estão também associadas com inflamação e proliferação celular e com o aparecimento e perpetuação de doenças crônicas. (Shemyakin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013), tais como hipertensão arterial, doença renal crônica e diabetes (Barton *et al.*, 2012; Kohan e Barton, 2014).

### **2.3.5 Angiotensina II**

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) é um dos mais importantes sistemas hormonais; regula a função do sistema cardiovascular, renal e das glândulas supra-renais e assim atua na regulação da pressão sanguínea, do volume dos fluidos corporais e no equilíbrio sódio-potássio (Ferrario e Strawn, 2006). O RAAS foi descoberto há mais de um século, e na década de 1930, Goldblatt e seus colaboradores demonstraram uma relação da renina com a função renal e a pressão arterial (Goldblatt *et al.*, 1934). Desde então, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar os componentes do RAAS e o seu papel na regulação do tônus vascular, na

regulação do volume corporal e na manutenção da pressão arterial. A hiperatividade do RAAS desencadeia uma variedade de doenças principalmente ligadas ao sistema cardiovascular, como hipertensão, aterosclerose, hipertrofia do ventrículo esquerdo, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e insuficiência cardíaca congestiva (Ferrario e Strawn, 2006).

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada na forma de pré-pró-renina nas células justaglomerulares do rim; após clivagem se transforma em pró-renina, e posteriormente em renina. Na presença de determinados estímulos é liberada na corrente sanguínea (Pimenta e Oparil, 2009). A renina age no seu substrato específico, o angiotensinogênio, formando a angiotensina I (Ang I), que por sua vez é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), resultando em uma angiotensina biologicamente ativa, a angiotensina II (Ang II). A Ang II, o principal metabólito do RAAS medeia os seus efeitos clássicos deste sistema por meio do receptor  $AT_1$  e através deste receptor, a Ang II exerce sua modulação na pressão arterial, pela qual cinco vias de ativação podem ser utilizadas: a via de inibição da adenilato ciclase e a via ativação da fosfolipase  $A_2$ , C, D e dos canais para cálcio (Dinh *et al.*, 2001). O receptor  $AT_1$  pode ser expresso como dois subtipos,  $AT_{1A}$  e  $AT_{1B}$  (Sasamura *et al.*, 1992; Moon, 2013).

Através dos receptores  $AT_1$ , a Ang II age, principalmente, na ativação do sistema nervoso simpático (SNS), na hipertrofia dos cardiomiócitos e do músculo liso vascular, na vasoconstricção renal, cerebral e coronariana, na retenção de sódio nos rins de forma direta ou por intermédio da liberação de aldosterona e na inibição da renina por feedback negativo (Cheng *et al.*, 2005).

A Ang II também atua nos receptores  $AT_2$ , cujos efeitos se opõem às ações da Ang II nos receptores  $AT_1$  (Navar *et al.*, 2002) e, quando ativada, seus efeitos incluem a diferenciação celular, a reparação tecidual e a apoptose, vasodilatação, desenvolvimento dos rins e do trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca (Batenburg *et al.*, 2004).

Sabe-se ainda que o RAAS tem duas vias contra-regulatórias, sendo a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) seu principal representante. Este heptapeptídeo é formado através da degradação da Ang II pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), pela degradação da Ang I por endopeptidases, ou de forma indireta pela hidrólise da angiotensina-(1-9), formada através da ação da

ECA-2 sob a angiotensina I (Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008). A Ang-(1-7) age por meio da ligação ao receptor Mas, acoplado a proteína G (Santos *et al.*, 2003) e atua de forma contrária a Ang II, agindo como anti-hipertensiva, anti-hipertrófica, anti-fibrótica e anti-trombótica (Santos *et al.*, 2004; Ferrario *et al.*, 2005; Iusuf *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008)

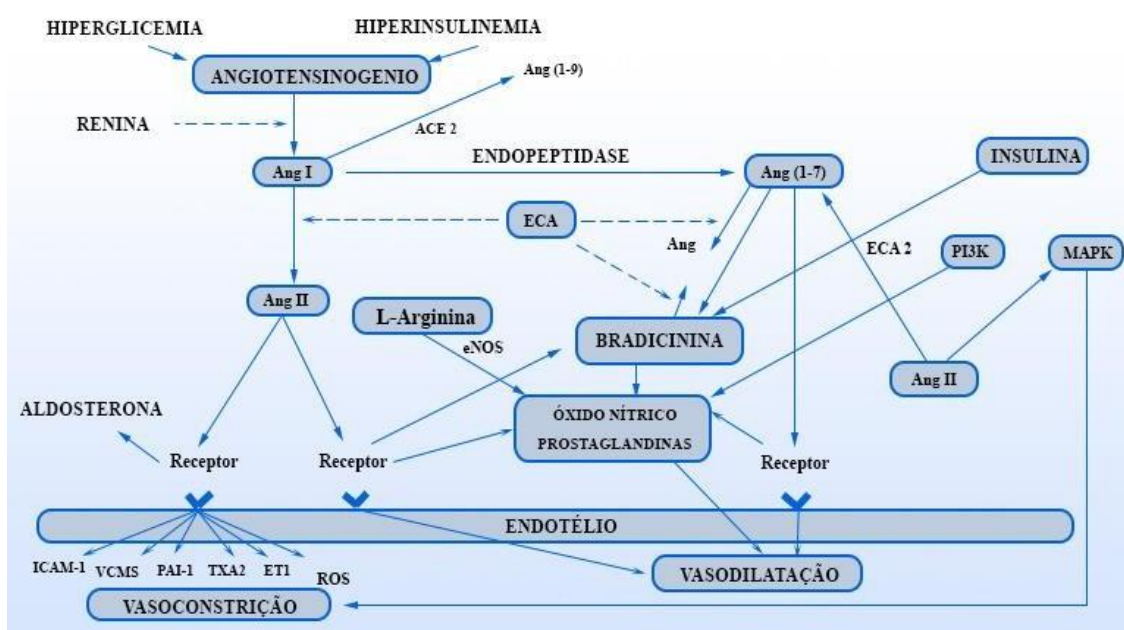


Figura 4: Componentes do sistema renina-angiotensina e suas interações. **Abreviações:** MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI3-K - Fosfatidilinositol 3-quinase; Ang, Angiotensina; ACE, enzima conversora de angiotensina; ACE2, enzima 2 conversora de angiotensina; AT1, AT2 – tipo 1 e tipo 2 de receptores angiotensinérgicos; Mas - Receptor específico da Angiotensina-(1-7); NO, óxido nítrico; eNOS, Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase; ROS, espécies reativas de oxigênios; ET1, endotelina 1; TXA<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>; PAI 1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; VCMS, células do músculo liso vascular; ICAM, Molécula de adesão intercelular. Fonte: Ribeiro-Oliveira *et al.*, 2008.

Além desses efeitos cardiovasculares, a Ang II interage no processo de homeostase da glicose e atua na patogênese do diabetes mellitus (FIGURA 4) através da inibição da transdução de sinal da insulina, redução da captação de glicose, resistência à insulina (Rahimi *et al.*, 2014) e destruição das células  $\beta$  pancreáticas devido ao estresse oxidativo (Sowers, 2004; Zhou, Schulman, 2009). Alguns estudos mostram que a inibição do RAAS reduziu a incidência do diabetes mellitus e suas complicações (Alberti *et al.*, 2005; Cutler *et al.*, 2008).

### 2.3.6 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) é uma definição que compreende uma série de moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio ( $O_2$ ), altamente reativas e parcialmente reduzidas, algumas delas sendo radicais livres, como o ânion superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e o peroxinitrito ( $OONO\bullet$ ) (Munzel *et al.*, 2002), espécies moleculares extremamente reativas que possuem um elétron não emparelhado em sua órbita mais externa (Halliwell, 1989; Munzel *et al.*, 2002; Halliwell, 2006).

A formação de ROS é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico. Elas são geradas dentro das células através de várias vias metabólicas: mitocôndrias, NADPH-oxidase da membrana plasmática (NOX) e de diferentes vias enzimáticas envolvidas em reações do tipo redox, tais como várias oxidases, peroxidase, citocromos, mono e di oxigenases e pelo desacoplamento da enzima sintase de óxido nítrico (Finkel, 2003).

A fim de evitar os prejuízos provocados pelas ROS, uma série de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas estão presentes no organismo (Finkel, 2003). Os ânions superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), a mais importante das ROS, podem ser dismutados por uma família de enzimas chamada superóxido dismutase (SOD). Três isoformas de SOD foram identificados: a SOD manganês (MnSOD, SOD2), localizada nas mitocôndrias e duas isoformas de SOD cobre zinco (Cu/ZnSOD, SOD1, expressa no meio intracelular, e SOD3, encontrada no líquido extracelular) (Peixoto *et al.*, 2009). O produto da dismutação do  $\bullet O_2^-$  pela SOD gera peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é convertido em água e  $O_2$  pela catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx) (Di Filippo *et al.*, 2006). Essas duas enzimas atuam através de mecanismos de prevenção, evitando e/ou controlando a formação de radicais livres e de outras espécies reativas, relacionadas com o início das reações em cadeia que resultam na propagação e amplificação do processo e, consequentemente, com a ocorrência de danos celulares oxidativos (Marchi *et al.*, 2012).

Por serem moléculas bastante reativas, as ROS podem infligir danos ao DNA da célula, assim como às proteínas e aos lipídeos (Halliwell e Whiteman, 2004). Acredita-se que o desequilíbrio redox causado por produção excessiva de ROS ou por redução das defesas antioxidantes desempenha um papel importante na patogênese das doenças cardiovasculares, incluindo a

hipertensão arterial sistêmica e pulmonar, a vasculopatia no diabetes, hipercolesterolemia, aterosclerose, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Irani, 2000; Napoli *et al.*, 2001). Além disso, o stress oxidativo está envolvido na patogênese de outras doenças crônicas, como a fibrose pulmonar e o câncer, bem como em doenças associadas ao envelhecimento (Giorgio *et al.*, 2007).

Outro papel importante das ROS é na sinalização celular, através da sua atuação como segundo mensageiro. No entanto, quando a produção de ROS é excessiva ou acontece uma redução nas defesas antioxidantes, ocorre a desregulação de muitos processos fisiológicos por elas mediado. Um dos efeitos mais conhecidos do aumento das ROS sobre sistema cardiovascular é a disfunção endotelial em humanos e modelos animais (Higashi *et al.*, 2009).

Varias evidências sugerem que a principal fonte de ROS ao nível vascular é o complexo enzimático associada à membrana e componente citosólico, NADPH-oxidase (NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Na parede arterial, a NADPH oxidase é expressa no endotélio vascular, no músculo liso e nas células adventícias, cuja hiperatividade tem sido associada a varias modificações da função vascular em condições patológicas (Guzik *et al.*, 2002). Esta enzima foi descrita pela primeira vez em fagócitos no sistema imunológico, onde é gerada uma produção de ROS intracelulares que estão envolvidas nos mecanismos de defesa do organismo contra possíveis patógenos (Ago *et al.*, 2004). Estruturalmente, a NADPH-oxidase dos fagócitos é composta por dois componentes essenciais ligados à membrana, o gp91phox/Nox2 e a p22phox e quatro componentes citosólicos, a p47phox, p67phox, p40phox e a rac2 (proteína G de baixo peso molecular) (Fearon e Faux, 2009). Existem hipóteses que mostram que a NADPH oxidase pode ser a principal fonte de  $O_2^-$  na hipertensão arterial, assim como em outras doenças cardiovasculares, uma vez que sua atividade pode ser regulada através de citocinas, hormônios e forças mecânicas intimamente relacionadas com a origem dessas doenças (Cai e Harrison, 2000).

Nas células não fagocitárias encontramos quatro homólogos: gp91phox (mais conhecida como NOX, subunidade catalítica) e estas fazem parte da família da NOX ("Nonphagocytic NADPH oxidase"), composta pela NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 e são expressas em vários

tecidos com funções biológicas relacionadas a defesa e ao crescimento celular (Drummond *et al.*, 2011; Konior *et al.*, 2014). No entanto, cada homólogo possui uma variabilidade específica tanto a nível celular quanto tecidual. Dentro da parede vascular, a localização das isoformas da NOX varia dependendo do tipo de célula e dos compartimentos celulares. Assim, as células endoteliais expressam NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5; as células musculares lisas expressam NOX1, NOX4 e NOX5; e os fibroblastos expressam principalmente a NOX2 e NOX4, cuja variabilidade pode ter implicações para a ação da NADPH oxidase. Nox4 foi altamente expressa em lesões ateroscleróticas, sugerindo um papel importante desta na regulação e proliferação das células endoteliais (Ago *et al.*, 2004).

Outro mecanismo através do qual a função endotelial é prejudicada é pela redução da biodisponibilidade do NO através do desacoplamento da eNOS ou nNOS que faz com que essas enzimas produzam  $\bullet\text{O}_2^-$  ao invés de NO. Vários mecanismos moleculares foram descritos a esse respeito. Curiosamente, o principal determinante do desacoplamento da NOS parece ser a disponibilidade do cofator tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Channon, 2004; Clempus & Griending, 2006). Algumas espécies reativas, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o ONOO<sup>-</sup> induzem degradação da BH<sub>4</sub>, que está associada com regulação negativa da eNOS. Este, por sua vez, leva a uma redução da quantidade de NO derivado do endotélio, o que prejudica o relaxamento vascular e proliferação de células endoteliais (Giacco & Brownlee, 2010). Por conseguinte, foi demonstrado que a suplementação com BH<sub>4</sub> melhora a função endotelial em pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia e insuficiência cardíaca (Fukuda *et al.*, 2002; Setoguchi *et al.*, 2002; Masano *et al.*, 2008) e que o aumento do estresse oxidativo nessas patologias correlaciona-se com uma insuficiência de BH<sub>4</sub> (Higashi *et al.*, 2009). Assim, a deficiência de BH<sub>4</sub> diminui a atividade da eNOS causando disfunção endotelial por meio de um aumento do estresse oxidativo. Este quadro acarreta a diminuição da produção de NO e aumento da produção de ROS. Logo, o dano endotelial aumenta o fator de risco para doenças cardiovasculares, uma vez que expõe estas células e as camadas celulares subjacentes a um processo inflamatório deletério, que em última análise conduz ao desenvolvimento de lesões vasculares, como processos ateroscleróticos (Irani, 2000; Napoli *et al.*, 2001).

## 2.4 Disfunção Endotelial e sua relação com o diabetes

A disfunção endotelial em alguns casos possui um papel chave na patogênese da doença vascular no diabetes. Inúmeros estudos têm revelado alterações da função endotelial em vasos de condutância e de resistência isolados, de ratos espontaneamente diabéticos (Meininger *et al.*, 2000), como também em ratos diabéticos induzidos quimicamente por aloxana (Lai *et al.*, 2007) ou estreptozotocina (Aloysius *et al.*, 2012). Resultados similares têm sido demonstrados em humanos portadores de diabetes insulino-dependente (McNally *et al.*, 1994; Arcaro *et al.*, 2002) e não insulino-dependente (Watts, Playford, 1998b), bem como em leitos vasculares isolados de outras espécies de animais diabéticos como coelhos e cães, em diferentes estágios da doença (Abiru *et al.*, 1990). Sua causa é multifatorial e acontece principalmente em decorrência da hiperglicemia (Brownlee, 2001), estresse oxidativo e dislipidemia (FIGURA 5) (Watts & Playford, 1998a).

A disfunção endotelial no diabetes mellitus tem como característica a redução dos níveis de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e aumento da geração de fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) (De Vriese *et al.*, 2000). Isto acontece em decorrência da glicotoxicidade direta, do aumento da atividade da PKC, das alterações na via dos polióis, do aumento da produção de radicais livres e da formação de produtos de glicação avançada (AGEs) (Brownlee, 2001).

De fato, tanto em aorta (Nassar *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2008) quanto no leito vascular mesentérico (Keegan *et al.*, 2000; Pannirselvam *et al.*, 2002) de animais diabéticos foi observado redução da vasodilatação dependente do endotélio, bem como o aumento da resposta contrátil em aorta e artérias de resistência (Chang *et al.*, 1993; Okon *et al.*, 2003; Xavier *et al.*, 2003)

A fonte de ROS em vasos de animais diabéticos não é completamente conhecida. Tesfamariam *et al.* (1994) sugere que o metabolismo do ácido araquidônico, através da ciclooxigenase é uma importante fonte geradora dessas espécies reativas de oxigênio. Sugere-se ainda a existência de outras fontes geradoras de ROS, as quais incluem: glicação não enzimática de proteínas (Mullarkey *et al.*, 1990; Kashiwagi *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 1996), auto-oxidação da glicose (Wolff e Dean, 1987) e aumento da atividade da NADPH oxidase (Ellis *et al.*, 1998). Somada à exacerbação de vias metabólicas

geradoras de radicais livres, foi observado também que animais diabéticos possuem uma diminuição de defesas antioxidantes endógenas como, por exemplo, a superóxido dismutase e a glutathione (Som *et al.*, 1981; Giugliano *et al.*, 1996; Kamata e Kobayashi, 1996).

Além do estresse oxidativo, já se demonstrou que no diabetes há uma produção aumentada de substâncias vasoconstritoras derivadas do endotélio, as quais podem contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento do processo de disfunção endotelial. Vários estudos têm mostrado que, no diabetes, bem com em preparações vasculares incubadas com elevada concentração de glicose, há uma produção aumentada de prostanóides vasoconstritores, tal como  $\text{TxA}_2$  e  $\text{PGH}_2$  (Teshamariam *et al.*, 1989). Ademais, outros potentes vasoconstritores, também liberados pelo endotélio, foram encontrados em níveis elevados em pacientes e animais diabéticos, como a endotelina-1 (Takahashi *et al.*, 1990; Hopfner *et al.*, 1999) e a angiotensina II (Goyal *et al.*, 1998).

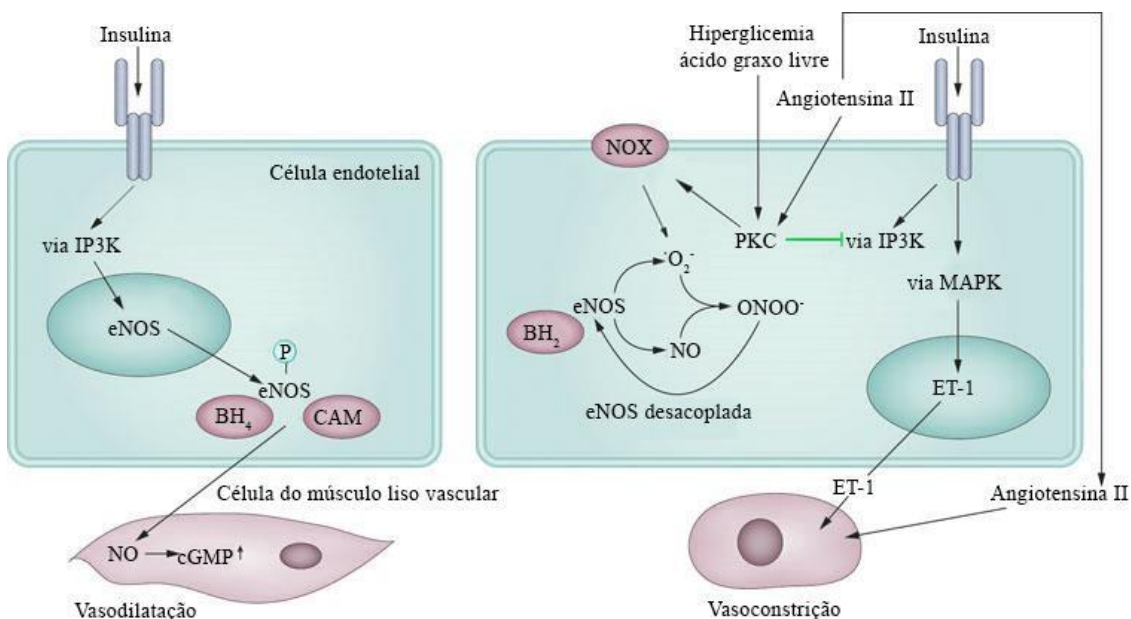


Figura 5: Mecanismo de vasoconstrição e vasodilatação na célula saudável (esquerda) e no diabetes mellitus (direita). Abreviações: BH<sub>2</sub>, dihidrobiopterina; MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno; PI3-K - Fosfatidilinositol 3-cinase; NO, óxido nítrico; ET-1, endotelina 1; NOX, NADPH oxidase; PKC, proteína cinase C. Fonte: Singh *et al.*, 2010.

Ainda, no diabetes observam-se alterações no metabolismo lipídico. A dislipidemia no diabetes é caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos, partículas de LDL, redução de HDL e aumento no fluxo de ácidos graxos livres

para o fígado (Erkelens, 1998). Essas alterações contribuem para o aumento do estresse oxidativo e podem atuar inibindo a atividade da eNOS (Woodman *et al.*, 2005).

#### **2.4.1 Hiperglicemia materna e a disfunção endotelial na prole**

A respeito dos danos causados pela hiperglicemia materna sobre a função vascular da prole, Holemans *et al.* (1999) foram um dos primeiros a demonstrar que ratos adultos oriundos de mães diabéticas apresentavam redução do relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas. Da mesma forma, Rocha *et al.* (2005) demonstraram um prejuízo da função endotelial em artérias mesentéricas de ratos adultos provenientes de ratas com diabetes e sugeriram que este efeito poderia estar relacionado ao o desenvolvimento de hipertensão arterial.

Mais recentemente, nosso grupo, ao estudar ratos machos adultos oriundos de mães diabéticas, verificou a existência de intolerância à glicose, resistência à insulina e hipertensão arterial em animais com 6 e 12 meses de idade. Além disso, quando analisada as artérias mesentéricas de resistência desses animais, também se observou alterações na função vascular decorrentes principalmente do aumento na produção de prostanoídes vasoconstritores derivados da COX-2, como o TxA<sub>2</sub>, a PGE<sub>2</sub> e a PGF<sub>2α</sub>, reduzindo o relaxamento dependente do endotélio e alterando a regulação da responsividade noradrenérgica no leito mesentérico (Ramos-Alves *et al.*, 2012a, b)

Corroborando estes resultados, filhos de mães diabéticas com idade entre 6 e 13 anos apresentam elevação de alguns marcadores plasmáticos de disfunção endotelial, como a e-selectina e o VCAM-1, além de elevação da circunferência abdominal (West *et al.*, 2011) e da pressão arterial sistólica, conhecido preditivo de risco para doenças cardiovasculares (Wright *et al.*, 2009; Halfon *et al.*, 2012). Estes estudos apoiam o conceito recente de memória glicêmica, visto que mesmo com o regresso à normoglicemia após a exposição à hiperglicemia temporária, ainda ocorre o aumento dos marcadores de danos vasculares em comparação com a normoglicemia *in vivo* e *in vitro* (El-Osta *et al.*, 2008; Nathan *et al.*, 2009). De fato, a exposição a um ambiente intrauterino hiperglicêmico está associada com a dislipidemia, principalmente

pelo aumento do colesterol total e LDL, inflamação vascular subclínica e processos de disfunção endotelial na prole, todos os quais estão ligados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (Kvietys & Granger, 2012).

Há muitos mecanismos propostos pelos quais a hiperglicemia materna induz disfunção endotelial na prole, incluindo a auto-oxidação da glicose, a produção de produtos de glicação avançada e a ativação da PKC (Bertuluci *et al.*, 2008). Além disso, o cordão umbilical de mulheres com diabetes gestacional apresenta elevados níveis de moléculas de adesão e marcadores para estresse oxidativo, incluindo aumento da xantina oxidase e redução de enzimas antioxidantes, o que também poderia afetar a função vascular do feto (FIGURA 6) (Brownlee, 2001).

No entanto, apesar da evidente ligação patogênica entre o aumento da concentração sanguínea de glicose e o surgimento das complicações vasculares no diabetes, os mecanismos que envolvem as manifestações clínicas do diabetes, a hiperglicemia e a disfunção vascular ainda continuam sendo matéria de grande discussão, uma vez que alguns modelos de diabetes não apresentam alterações do funcionamento endotelial. Uma possível explicação para esses achados pode ser em decorrência das diferenças atribuídas aos gêneros, uma vez que machos e fêmeas possuem características fisiológicas sexuais e hormonais particulares. Portanto, essas alterações serão abordadas a seguir, visto que são determinantes para a patogênese das alterações vasculares no diabetes.

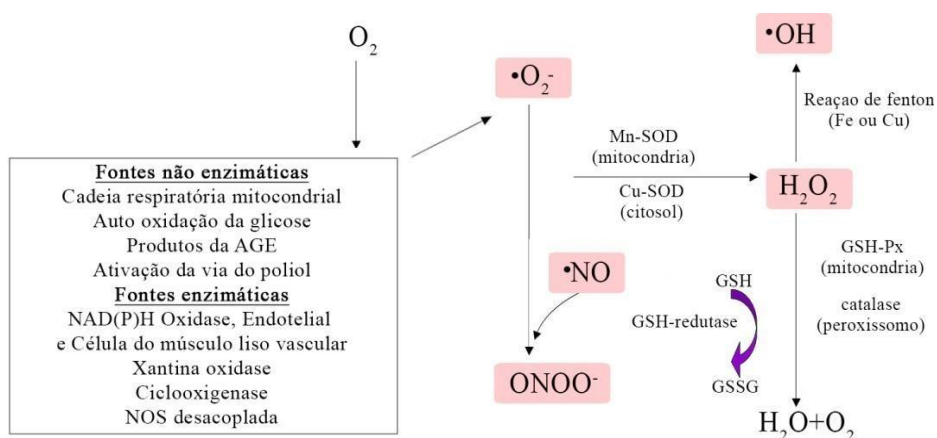


Figura 6: Produção de espécies reativas no diabetes. Fonte: Johansen *et al.*, 2005.

## 2.5 Hormônios sexuais

Todos os hormônios são caracterizados como hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os hormônios hidrossolúveis usam receptores localizados na superfície da membrana da célula do tecido-alvo e representam a grande maioria dos hormônios conhecidos. Já os hormônios lipossolúveis, dentre eles os esteroides, atravessam a membrana plasmática, e vão de encontro aos receptores no citoplasma e/ou no núcleo da célula alvo. Através desta ligação hormônio-receptor ocorre o início da transcrição do DNA. Como receptores desses hormônios esteroides têm-se o receptor de estrogênio (RE), o receptor de progesterona (RP), o receptor dos hormônios tireoidianos, os receptores de vitamina D e de retinóide, todos pertencentes à superfamília dos receptores nucleares. (Mangelsdorf & Evans, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Os hormônios androgênicos são utilizados para designar as características primárias do embrião, as características sexuais secundárias na puberdade e a expressão do fenótipo masculino, além de serem importantes na iniciação e manutenção da espermatogênese. É encontrado em pequena quantidade nas mulheres. Sua ação é mediada através do receptor de androgênio (RA) que é parte da superfamília dos receptores nucleares e, atualmente apenas um tipo de receptor para androgênio, de cDNA foi identificado. O gene do seu receptor é localizado na posição Xq11-12, no cromossomo X com peso molecular de aproximadamente 110 kDa e sua estrutura é semelhante aos outros genes que codificam os hormônios esteroidais. E em relação aos principais tipos de androgênios, temos a testosterona e androsterona. (Mangelsdorf & Evans, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Brinkmann, 2001).

O mecanismo fisiológico que irá resultar na síntese de estrogênio é a transformação do androgênio através da ação de um complexo enzimático de aromatasas (Aro), também conhecido como citocromo P450arom ou CYP19, uma das diversas enzimas da família do citocromo P450 (Ackerman e Carr, 2002). A aromatase catalisa a conversão de  $\Delta^4$ -androstenediona em estrona e testosterona em estradiol e, é largamente expressa em vários tipos de tecidos, tais como nos testículos (células de Leydig e Sertoli), nos ovários (corpo lúteo e nas células granulosas), no cérebro (incluindo o hipotálamo), nos folículos capilares e nos fibroblastos (Simpson & Davis, 2001). Também podemos

encontrá-los em homens para regulação do comportamento sexual masculino, manutenção do esqueleto, do sistema cardiovascular, para a função normal dos testículos e da próstata e ainda expressa no tecido adiposo o que caracteriza uma importante fonte de estrogênio para o sexo masculino (Pettersson e Gustafsson, 2001). Além disso, é responsável pela biodisponibilidade e degradação do estrogênio. Sua estrutura é formada por um sítio de ligação com a presença de uma molécula de ferro e outro com uma ligação esteroidal, (FIGURA 7), a qual servirá como ligante para o androgênio durante a sua produção de estrogênio (Simpson *et al.*, 1994; Murphy, 1998; Simpson & Davis, 2001; Simpson, 2003; Stocco, 2012).

Em geral, o estrogênio possui uma variedade de respostas fisiológicas que ocorrem através da interação específica entre o hormônio e a proteína receptora nos tecidos-alvos através da ligação com o receptor nuclear no interior da célula-alvo que abrange tecidos em diferenciação, em crescimento e síntese proteica. O estrogênio promove o crescimento e a diferenciação de outros tecidos, tais como o nervoso, adiposo, musculoesquelético e do sistema cardiovascular. É o hormônio sexual predominante nas mulheres, e sua principal função está vinculada com o crescimento dos tecidos, dos órgãos sexuais da mulher e também relacionados com a reprodução, incluindo o endométrio, útero e as glândulas mamárias. Entretanto, possui profundos efeitos no sistema reprodutivos de ambos os sexos (Korach, 1994; Enmark *et al.*, 1997; Ackerman e Carr, 2002).

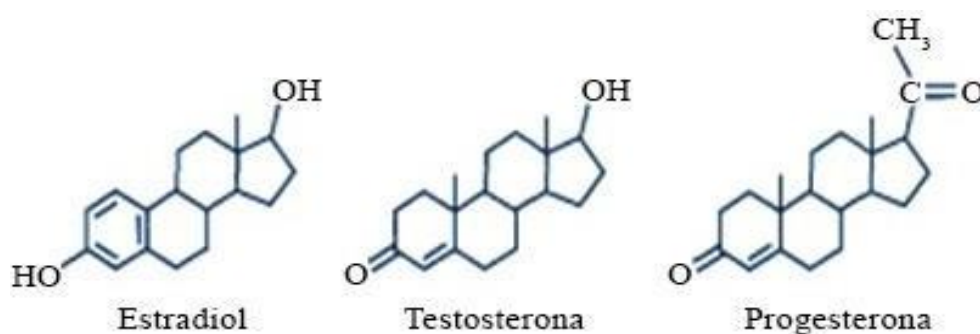


Figura 7: Estrutura molecular dos hormônios estradiol, testosterona e progesterona. Fonte: <http://www.chemspider.com>

Para ativar todos esses efeitos fisiológicos, o estrogênio deve interagir e ativar o receptor de estrogênio (RE), assim ocorrerá a correta ativação

hormonal. Inicialmente, apenas uma isoforma da proteína receptora para o estrogênio foi encontrada, denominado receptor de estrogênico  $\alpha$  (RE $\alpha$ -NR3A1) (Anbalagan & Rowan, 2015). Entretanto, na década de 1980, foi clonado e caracterizado um novo receptor, o receptor estrogênico  $\beta$  (RE $\beta$  - NR3A2). Ambos fazem parte da superfamília dos genes que formam os receptores nucleares (RN) de vários ligantes hidrofóbicos, como por exemplo, o estrógeno (RE), a progesterona (RP), androgênios (RA), os glucocorticóides (RG) e os mineralocorticoides (RM), todos caracterizados como hormônios esteróides (receptores do tipo 1) (Korach, 1994; Enmark *et al.*, 1997; Ackerman e Carr, 2002)

O receptor de estrogênio  $\alpha$  é expresso abundantemente no útero, vagina, ovários, glândula mamária, e hipotálamo (Ascenzi *et al.*, 2006), enquanto o receptor estrogênico  $\beta$  é principalmente expresso no homem na próstata e na mulher nos ovários, com menor quantidade no pulmão, cérebro e ossos em ambos os sexos (Miller & Duckles, 2008). Além disso, cada receptor possui seu respectivo papel fisiológico no sistema imunológico, esquelético, nervoso e cardiovascular (Harris, 2007; Heldring *et al.*, 2007) e podem ser encontrados no músculo liso vascular e em células endoteliais (Mendelsohn, 2002). No entanto, estas duas isoformas sinalizam de forma diferente, dependendo do gênero, da localização do vaso e da espécie estudada, uma vez que em mulheres a expressão de RE $\beta$  é mais significativa, bem como na artéria coronária, artéria ilíaca, aorta e veia safena (Hodges *et al.*, 2000). Já em ratas, o RE $\alpha$  é expresso no útero e o RE $\beta$  é mais encontrado na aorta, cauda e no útero desses animais (Hodges *et al.*, 2000; Andersson *et al.*, 2001)

O RE $\alpha$  e o RE $\beta$  são sintetizados em cromossomos diferentes. O RE $\alpha$ , codificado pelo gene ESR1, é localizado no braço longo do cromossomo 6 e codifica 595 aminoácidos, com peso molecular de cerca de 40 KDa, enquanto que o RE $\beta$ , codificado pelo gene ESR2, localiza-se no cromossomo 14 e tem peso de aproximadamente 140 KDa e codifica 530 aminoácidos (Kuiper *et al.*, 1997; Hodis *et al.*, 2001; Ascenzi *et al.*, 2006). O RE $\alpha$  e o RE $\beta$  possuem 44% dos genes homólogos na sua sequência de aminoácidos totais, sendo parte da estrutura de domínio comum aos membros da superfamília nuclear: A/B, C, D, E e F (Zhao *et al.*, 2008). Apesar desse elevado grau de homologia no domínio da ligação de DNA, apresentam diferenças consideráveis no domínio N

terminal e no domínio E (Bardin *et al.*, 2004).

São atribuídos ao estrogênio múltiplos efeitos vasculares, incluindo as alterações das concentrações de lipídios séricos, coagulação, fibrinólise, produção de moléculas vasoativas, tais como o óxido nítrico e as prostaglandinas e propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Miller e Mulvagh, 2007). E este último pode ser visto pela participação do estrogênio na inibição da NADPH oxidase, a qual atua na redução na formação de ROS tais como os ânions superóxidos (Miller & Mulvagh, 2007; Miller & Duckles, 2008).

O estrogênio também possui efeito biológico no vasorrelaxamento e atua na inibição da resposta dos vasos sanguíneos a lesões e ao desenvolvimento de aterosclerose (Mendelsohn, 2002). Estes processos biológicos são regulados através de ambas as vias genômicas e não genômicas (Miller e Duckles, 2008). Dentre as suas ações não genômicas, o estrogênio pode influenciar a produção de NO, mediado pelo receptor ER $\alpha$  e pela cascata de sinalização IP<sub>3</sub>/AKT, que depois de fosforilada desencadeia a fosforilação da eNOS, o que aumenta a capacidade de produção de NO (Haynes *et al.*, 2000). Entre os efeitos genômicos, observa-se a redução do tônus vascular também via NO, através da estimulação da expressão da eNOS, sugerindo que os efeitos do óxido nítrico no endotélio podem ser devido a atuação de várias vias de sinalização e múltiplas enzimas (Tan *et al.*, 1999).

## **2.6 O estrogênio e a função cardiovascular**

A principal função do estrogênio é o crescimento dos tecidos, dos órgãos sexuais femininos e de outros tecidos relacionados com a reprodução (Ackerman & Carr, 2002). No entanto, o estrogênio está envolvido na regulação de diversos processos, incluindo o tônus vascular e a angiogênese (Miller & Mulvagh, 2007). Ao estrogênio atribui-se vários efeitos diretos sobre a função vascular (Miller & Mulvagh, 2007) e, como as doenças cardiovasculares (DCV's) afetam homens e mulheres de forma diferente, sendo o sexo feminino relativamente protegido quando comparado com homens jovens na mesma idade e mulheres pós-menopausadas (Knepper & Giuliani, 1995; Sowers, 1998), atribui-se esta vasoproteção possivelmente aos altos níveis de estrogênio, especialmente do 17- $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) (Regitz-Zagrosek, 2006).

No que se refere aos dados de hipertensão, sabe-se que em ratos

espontaneamente hipertensos, o relaxamento dependente do endotélio é maior em vasos arteriais de fêmeas do que de machos (Kauser & Rubanyi, 1995). Além disso, observa-se melhora da função endotelial em fêmeas ovariectomizadas dessa linhagem quando utilizados agonistas específicos para os receptores RE $\alpha$ , (Widder *et al.*, 2003). Isso porque em animais ovariectomizadas, a exposição imediata ao E<sub>2</sub> produz melhora no tônus de suas artérias como resultado do aumento da produção de NO mediado pelos receptores de estrogênio (Nilsson *et al.*, 2000; Darblade *et al.*, 2002). A exposição a esse hormônio desencadeia a fosforilação e ativação da MAPK/ERK e IP<sub>3</sub>, relacionadas com o efeito vasorrelaxante do estrogênio (Geraldes *et al.*, 2002).

Essas evidentes relações entre hormônios femininos e sistema cardiovascular, são apontadas em humanos, e os dados comprovam que mulheres pós-menopausadas, sem uso da terapia hormonal, apresentaram prejuízo da função endotelial em artérias de resistência, e após a exposição desses vasos ao estrogênio, há melhora dessa função (Kublickiene *et al.*, 2005).

Os mecanismos de vasodilatação dependente do endotélio induzido por estrogênio incluem modificações na síntese, liberação e atividade dos fatores relaxantes, tais como o NO, a PGI<sub>2</sub> e o EDHF, bem como por reduzir fatores contráteis, tais como a endotelina-1 e o TxA<sub>2</sub> (Koledova & Khalil, 2007). Durante a gestação, ocorre aumento da eNOS nas artérias uterinas o que sugere que o NO derivado do endotélio está envolvido nas ações vasorrelaxantes do E<sub>2</sub> (Nelson *et al.*, 2000). Além disso, a liberação de NO endotelial é maior nas artérias de fêmeas em comparação com machos, indicando que o estrogênio pode mediar as diferenças decorrente do gênero na produção de NO (Knot *et al.*, 1999). Adicionalmente, nos vasos sanguíneos de animais machos o superóxido vascular apresenta maiores níveis em comparação com os encontrados em fêmeas (Koledova & Khalil, 2007).

O estrogênio possui propriedades antioxidantes: diminui a expressão de NADPH-oxidase, a geração de  $\bullet\text{O}_2^-$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumenta a biodisponibilidade de NO (Vina *et al.*, 2011). Em ratas ovariectomizadas, o aumento da pressão sanguínea está associado a menores níveis de antioxidantes, aumento de lipoperóxidos no plasma e de radicais livres em nível vascular, que podem ser

prevenidos através da administração de  $E_2$  (Hernandez *et al.*, 2000). Do mesmo modo, o  $E_2$  afeta a função mitocondrial através do aumento da fosforilação oxidativa enquanto reduz a produção de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial (Miller & Duckles, 2008).

No que tange às correlações entre os efeitos cardiometabólicos dos estrógenos, um estudo demonstra que após a ovariectomia os animais apresentam aumento de peso associado à resistência à insulina (Lemieux *et al.*, 2003), sugerindo, portanto, ação protetora desses hormônios. Esse resultado pode ser relacionado ao fato de que, em mulheres menopausadas, a incidência de diabetes mellitus tipo 2 é maior entre as que não fazem uso da terapia de reposição hormonal (Margolis *et al.*, 2004). Portanto, observa-se que além dos efeitos sobre o sistema cardiovascular, o estrogênio atua modulando a atividade metabólica, sendo capaz de interferir no surgimento e estabelecimento da obesidade e de resistência à insulina.

Os efeitos do estrogênio sobre a função endotelial também resulta de suas ações sobre a via da COX e a liberação de fatores vasoativos desta via (Barber & Miller, 1997; Orshal & Khalil, 2004). O estrogênio pode modular a ativação cruzada entre as vias da NOS e da COX, onde a vasodilatação dependente de NO, induzida pelo estrogênio pode estar acompanhada de diminuição na via da COX (Case & Davison, 1999). O estrogênio também atua na produção da  $PGI_2$  (Geary *et al.*, 2000) através do  $RE\alpha$ , por ativação da COX-2 e esse mecanismo impede tanto a ativação plaquetária quanto a indução de estresse oxidativo. Ao suprimir o receptor para  $PGI_2$  em ratas ovariectomizadas o efeito protetor do estrogênio contra a formação de aterosclerose foi abolido, sugerindo que o uso de inibidores seletivos da COX-2 pode desempenhar efeitos cardioprotetores em mulheres menopausadas (Egan *et al.*, 2004). O estrogênio modula ainda a liberação de prostanóides contrateis derivados do metabolismo da COX-2. Neste sentido, Martorell *et al.* (2009) demonstraram que a ovariectomia promoveu aumento na liberação de prostanóides derivados da COX-2 na aorta de ratas, o qual foi revertido pela administração de  $E_2$  (Martorell *et al.*, 2009).

Barber & Miller, (1997) utilizando um inibidor inespecífico da COX, a indometacina, verificaram que ocorreu um aumento no relaxamento vascular dependente do endotélio em artérias de animais machos, entretanto, esse

efeito não foi observado em animais do sexo feminino. Relacionando outros estudos ao *cross-talk* existente entre ação vasorrelaxante do E2 e participação da COX, estudos demonstram que a indometacina não altera o relaxamento induzido por E2 na artéria coronária quando há integridade endotelial, porém, o mesmo não acontece em artérias sem endotélio (Jiang *et al.*, 1991). Somado a isso, apesar de o estrogênio ter aumentado a expressão de COX-1, bem como a síntese de PGI<sub>2</sub> em cultura de células endoteliais, o hormônio induziu o relaxamento em artérias sem endotélio (Orshal & Khalil, 2004; Oviedo *et al.*, 2005). Tais dados sugerem um efeito direto do hormônio sobre o músculo liso vascular.

De acordo com o exposto até o presente momento, fica evidente que a hiperglicemia materna durante o desenvolvimento fetal se torna fator preditivo para o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Um dos fatores que contribuem para essa condição patológica são as disfunções vasculares, que podem acontecer em decorrência do desbalanço por redução do relaxamento dependente do endotélio pela menor liberação e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, como o NO, ou por um aumento de substâncias vasoconstritoras, como a angiotensina II, os ânions superóxido e alguns metabólitos do ácido araquidônico. Entretanto, indivíduos do sexo feminino possuem um efeito cardioprotetor que está relacionado ao efeito benéfico/protetor do estrogênio, visto sua atuação no tônus vascular por de meio de suas ações de modulação sobre a síntese/ liberação/ bioatividade dos fatores de relaxamento derivados do endotélio, como o NO.

Diversos aspectos das alterações vasculares dos animais expostos à hiperglicemia materna já foram estudados por nosso grupo e por outros autores. Entretanto, estes estudos se propuseram a avaliar os mecanismos pelos quais essa exposição prejudica a função endotelial apenas em animais do sexo masculino, sem explorar de que forma as diferenças de gênero influencia o desenvolvimento destes distúrbios vasculares em animais do sexo feminino. No que se refere a estudos em fêmeas, a literatura é bastante escassa sobre desenvolvimento de disfunção vascular em consequência da exposição à hiperglicemia materna, dessa forma, surgiu então o interesse pela investigação dessa situação sobre parâmetros cardiovasculares bem como sobre como os mecanismos envolvidos.

### 3 OBJETIVOS

#### Gerais

Comparar os efeitos da hiperglicemia materna presente durante o período intrauterino e perinatal em ratos sobre parâmetros hemodinâmicos e sobre a função vascular, das proles macho e fêmea quando adultas.

#### Específicos

- Identificar nas proles alterações sobre a pressão arterial e frequência cardíaca provocadas pelo diabetes gestacional relacionando com a idade;
- Avaliar diferenças dependentes do sexo sobre a reatividade vascular através da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e da resposta vasoconstritora à estimulação alfa-adrenérgica, em artérias de condutância e de resistência das proles; identificar os mecanismos endoteliais da programação fetal induzida pela hiperglicemia materna envolvidos nos diferentes efeitos entre os sexos.
- Analisar o efeito da excisão ovariana sobre a pressão arterial e reatividade vascular da prole fêmea;
- Estimar o efeito do tratamento de reposição estrogênica sobre esses parâmetros cardiovasculares em ratas ovariectomizadas da prole;
- Verificar o papel das diferenças de sexo sobre o estresse oxidativo e atividade de derivados vasoconstritores e vasorrelaxantes em ambos leitos vasculares da prole de ratas diabéticas.

## REFERÊNCIAS

- Abiru T, Watanabe Y, Kamata K, Miyata N , Kasuya Y. (1990). Decrease in endothelium-dependent relaxation and levels of cyclic nucleotides in aorta from rabbits with alloxan-induced diabetes. *Res comm in chem patholog and pharmacol.* 68, 13-25.
- Ackerman GE, Carr BR. (2002). Estrogens. *Rev Endocr Metab Disord.* 3, 225-30.
- Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circul.* 109, 227-33.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet.* 366, 1059-62.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357, 593-615.
- Aloysius UI, Achike FI, Mustafa MR. (2012). Mechanisms underlining gender differences in Phenylephrine contraction of normoglycaemic and short-term Streptozotocin-induced diabetic WKY rat aorta. *Vascul Pharmacol.* 57, 81-90.
- Alp NJ, Channon KM. (2004). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arter, thromb, and vasc biol.* 24, 413-20.
- Alvarez Y, Briones AM, Balfagon G, Alonso MJ, Salaices M. (2005). Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 23, 767-77.
- Anbalagan M, Rowan BG. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and

- its functional impact in human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 3, 264-72.
- Andersson C, Lydrup ML, Ferno M, Idvall I, Gustafsson J, Nilsson BO. (2001). Immunocytochemical demonstration of oestrogen receptor beta in blood vessels of the female rat. *J Endocrinol.* 169, 241-7.
- Anna V, van der Ploeg HP, Cheung NW, Huxley RR, Bauman AE. (2008). Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005. *Diabetes care.* 31, 2288-93.
- Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. (2005). Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circul.* 112, 759-70.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 348, 730-32.
- Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. (2002). Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circul.* 105, 576-82.
- Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 27, 299-402.
- Ategbro JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. (2006). Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 4137-43.
- Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, Kreutzenberg SD, Fadini GP. (2011). Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes care.* 34 Suppl 2, S285-90.

- Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Häring HU. (2000). Endothelial Dysfunction Is Detectable in Young Normotensive First-Degree Relatives of Subjects With Type 2 Diabetes in Association With Insulin Resistance. *Circul.* 101(15):1780-4.
- Barber DA, Miller VM. (1997). Gender differences in endothelium-dependent relaxations do not involve NO in porcine coronary arteries. *The Am J of Physiol.* 273, H2325-32.
- Barker DJ. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj.* 311, 171-4.
- Barker DJ (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science (London, England : 1979).* 95(2):115-128
- Barker DJ. (2002). Fetal programming of coronary heart disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 13, 364-8.
- Barker DJ. (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992) Supplement.* 93, 26-33.
- Barker DJ, Osmond C. (1988). Low birth weight and hypertension. *BMJ.* 297, 134-5.
- Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 298, 564-7.
- Barton M, Kiowski W. (2001). The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 3, 322-30.
- Barton M. (2012). Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *Brit J of Pharmacol.* 165, 591-602.

- Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, Van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. (2004). Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*. 109, 2296-301.
- Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature*. 430, 419-21.
- Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C. (2001). Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 947, 93-109.
- Bertino E, Raia M, Cresi F, Maggiora E, Coscia A, Gilli G. (2013). Newborn from mother with disorders of glucose homeostasis. *Earl Hum Developm*. 89, S64-65.
- Blaustein MP, Hamlyn JM. (2010). Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na(+)/Ca(2+) exchanger and TRPC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1802, 1219-29.
- Blondeau B, Joly B, Perret C, Prince S, Bruneval P, Lelievre-Pegorier M, Fassot C, Duong Van Huyen JP. (2011). Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. *Diabetes Metab*. 37, 245-51.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 368, 850-3.
- Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. (1984). Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol*. 351, 549-72.

- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 36, 1187-205.
- Brinkmann AO. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol and cel endocrinol.* 179, 105-9.
- Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414, 813-20.
- Burnstock G, Ralevic V. (1994). New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Brit J of P Sur.* 47, 527-43.
- Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. (1987). Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circul.* 75, 1102-9.
- Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. (1999). Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes.* 48, 1856-62.
- Cai H, Harrison DG. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87, 840-4.
- Campia U, Choucair WK, Bryant MB, Quyyumi AA, Cardillo C, Panza JA. (2002). Role of cyclooxygenase products in the regulation of vascular tone and in the endothelial vasodilator function of normal, hypertensive, and hypercholesterolemic humans. *The Am J of Card.* 89, 286-90.
- Cartier A, Lemieux I, Almeras N, Tremblay A, Bergeron J, Despres JP. (2008). Visceral obesity and plasma glucose-insulin homeostasis: contributions of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in men. *J Clin Endocrinol*

Metab. 93, 1931-8.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 184, 409-20.

Case J, Davison CA. (1999). Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation. *The J of Pharmacol and Exper Ther.* 291, 524-30.

Casey BM, Lucas MJ, McIntire DD, Leveno KJ. (1997). Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. *Obstet Gynecol.* 90, 869-73.

Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S. (2011). Is it time to revisit the Pedersen hypothesis in the face of the obesity epidemic ? *Am J of Obst and Gynec.* 204, 479-87.

Cersosimo E, DeFronzo RA. (2006). Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev.* 22, 423-36.

Chang KC, Chung SY, Chong WS, Suh JS, Kim SH, Noh HK, Seong BW, Ko HJ, Chun KW. (1993). Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *The J of Pharm and Exper Ther.* 266, 992-1000.

Chen G, Suzuki H, Weston AH. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Brit J of Pharm.* 95, 1165-74.

Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. (2005). Angiotensin II and vascular inflammation. *Medical science monitor. Intern Med J of Exper and Clin Res.* 11, Ra194-205.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Joseph L. Izzo J, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Jackson T. Wright J, Roccella EJ, Committee atNHBPEPC. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. JAMA. 289, 2560-71.

Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, Dietz PM. (2007). Maternal Obesity and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. Diab Care. 30(8):2070-6

Clempus RE, Griendling KK. (2006). Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. Card Res. 71, 216-25.

Cottrell EC. (2009). Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. Front in Behav Neuroscien. 30(8): 2070-6.

Crume TL, Ogden L, West NA, Vehik KS, Scherzinger A, Daniels S, McDuffie R, Bischoff K, Hamman RF, Norris JM, Dabelea D. (2011). Association of exposure to diabetes in utero with adiposity and fat distribution in a multiethnic population of youth: the Exploring Perinatal Outcomes among Children (EPOCH) Study. Diabetolog. 54, 87-92.

Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE, Roccella EJ. (2008). Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988-1994 and 1999-2004. Hypert. 52, 818-27.

Dabelea D. (2007). The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. Diabet care. 30 Suppl 2, S169-74.

Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. (2002). Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. Circ Res.

90, 413-9.

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *Brit J of Phar.* 130, 963-74.

Deussen A, Brand M, Pexa A, Weichsel J. (2006). Metabolic coronary flow regulation--current concepts. *Basic Res Cardiol.* 101, 453-64.

Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M. (2006). Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev.* 24, 77-87.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond).* 100, 481-92.

Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Disc.* 10, 453-71.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Putte LBAVD, Lipsky PE. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12(12):1063-73.

Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, Fitzgerald GA. (2004). COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science.* 306, 1954-7.

Egeland GM. (2015). Following in mother's footsteps? Mother–daughter risks for insulin resistance and cardiovascular disease 15 years after gestational diabetes. *Diabetic Medic.* 27, 257-65.

El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia.

The J of Exper Med. 205, 2409-17.

Ellis EA, Grant MB, Murray FT, Wachowski MB, Guberski DL, Kubilis PS, Luty GA. (1998). Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic Biol Med.* 24, 111-20.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 4258-65.

Erkelens DW. (1998). Diabetic dyslipidaemia. *Europ hear J.* 19, Suppl H, H27-40.

Fearon IM, Faux SP. (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol.* 47, 372-81.

Féletou M, Vanhoutte PM. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Brit J of Pharm.* 93, 515-24.

Ferrario CM, Strawn WB. (2006). Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. *Am J of Card.* 98, 121-28.

Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. (2005). Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289, H2281-90.

Finkel T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 247-54.

Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Tare M, Parkinson HC. (2005). Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during

diabetes. Clin Exp Pharmacol Physiol. 32, 482-7.

Frolich JC, Forstermann U. (1989). Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. Adv Prostagl Thromb Leukot Res. 19, 211-5.

Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. (1997). Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. Brit J Pharm. 121, 1383-91.

Fukuda Y, Teragawa H, Matsuda K, Yamagata T, Matsuura H, Chayama K. (2002). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. Heart (British Cardiac Society). 87, 264-9.

Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288, 373-6.

Geary GG, Krause DN, Duckles SP. (2000). Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms. Am J of Phys Heart and Circul Physiol. 279, H511-9.

Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. (2002). Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. Arter, thromb and vasc Biol. 22, 1585-90.

Giacco F, Brownlee M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 107, 1058-70.

Gimbrone MA, Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. The Am J of Patholog. 155, 1-5.

- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 722-8.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabet Care.* 19, 257-67.
- Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. (2005). Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Brit J of Pharm.* 146, 834-45.
- Godfrey KM, Barker DJ. (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 71(5 S):1344S-52S.
- Godfrey KM, Barker DJ. (2001). Fetal programming and adult health. *Publ Heal Nutr.* 4, 611-24.
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. (1934). Studies on experimental hypertension : i. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J exp med.* 59(3):347-79.
- Gopinath B, Baur LA, Garnett S, Pfund N, Burlutsky G, Mitchell P. (2011). Body mass index and waist circumference are associated with blood pressure in preschool-aged children. *Ann Epidemiol.* 21, 351-7.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 105, 1656-62.
- Hahn C, Schwartz MA. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 53-62.

- Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 303, 1019-22.
- Halfon N, Verhoef PA, Kuo AA. (2012). Childhood antecedents to adult cardiovascular disease. *Pediatr Rev*. 33, 51-60; quiz 61.
- Halliwell B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *J of the R Soc of Med*. 82, 747-52.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Phys*. 141, 312-22.
- Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brit J of Pharm*. 142, 231-55.
- Harris HA. (2007). Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol*. 21, 1-13.
- Hay WW, Jr. (2012). Care of the infant of the diabetic mother. *Curr Diab Rep*. 12, 4-15.
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*. 87, 677-82.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 87, 905-31.
- Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A. (2006). Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des*. 12, 205-15.

- Hernandez I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC , Carbonell LF. (2000). 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J of Phys Reg, Integr and Comp Phys.* 279, R1599-605.
- Hewett PW , Murray JC. (1993). Human lung microvessel endothelial cells: isolation, culture, and characterization. *Microv Res.* 46, 89-102.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M , Kihara Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 73, 411-8.
- Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P , Rozing J. (2001). Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 107, 1411-22.
- Hisamoto K, Ohmichi M, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, Hayakawa J, Mabuchi S, Takahashi K, Tasaka K, Miyamoto Y, Taniguchi N , Murata Y. (2001). Induction of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by the raloxifene analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 276, 47642-9.
- Hodges YK, Tung L, Yan XD, Graham JD, Horwitz KB , Horwitz LD. (2000). Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circ.* 101, 1792-8.
- Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH, Liu Cr CR, Liu Ch CH , Azen SP. (2001). Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 135, 939-53.
- Hopfner RL, McNeill JR , Gopalakrishnan V. (1999). Plasma endothelin levels

and vascular responses at different temporal stages of streptozotocin diabetes. *Eur J of Pharm.* 374, 221-7.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R , Morgan KG. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 76, 967-1003.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K , Masaki T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(8):2863-7.

Irani K. (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 87, 179-83.

Iusuf D, Henning RH, van Gilst WH , Roks AJ. (2008). Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J of Pharmacol.* 585, 303-12.

Jadhav V, Jabre A, Lin SZ , Lee TJ. (2004). EP1- and EP3-receptors mediate prostaglandin E2-induced constriction of porcine large cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24, 1305-16.

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA , Collins P. (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Brit J of Pharmacol.* 104, 1033-7.

Kamata K , Kobayashi T. (1996). Changes in superoxide dismutase mRNA expression by streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol.* 119, 583-9.

Kang KT. (2014). Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol Res.* 30, 141-8.

Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R , Shigeta

- Y. (1996). Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes*. 45 Suppl 3, S84-6.
- Kauser K , Rubanyi GM. (1995). Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypert*. 25, 517-23.
- Keegan A, Jack AM, Cotter MA , Cameron NE. (2000). Effects of aldose reductase inhibition on responses of the corpus cavernosum and mesenteric vascular bed of diabetic rats. *J of Card Pharm*. 35, 606-13.
- Kelstrup L, Damm P, Mathiesen ER, Hansen T, Vaag AA, Pedersen O , Clausen TD. (2013). Insulin resistance and impaired pancreatic beta-cell function in adult offspring of women with diabetes in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 98, 3793-801.
- Kifor I, Dzau VJ. (1987). Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res*. 60, 422-8.
- Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS , Morgan KG. (2008). Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J of cell and mol med*. 12, 2165-80.
- Kitzmiller JL, Block JM, Brown FM, Catalano PM, Conway DL, Coustan DR, Gunderson EP, Herman WH, Hoffman LD, Inturrisi M, Jovanovic LB, Kjos SI, Knopp RH, Montoro MN, Ogata ES, Paramsothy P, Reader DM, Rosenn BM, Thomas AM , Kirkman MS. (2008). Managing preexisting diabetes for pregnancy: summary of evidence and consensus recommendations for care. *Diab care*. 31, 1060-79.
- Knepper LE , Giuliani MJ. (1995). Cerebrovascular disease in women. *Card*. 86, 339-48.
- Knot HJ, Lounsbury KM, Brayden JE , Nelson MT. (1999). Gender differences

in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  and eNOS activity. *The Am J of Phys.* 276, H961-9.

Kohan DE , Barton M. (2014). Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney international.* 86, 896-904.

Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW , Pollock DM. (2011). Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev.* 91, 1-77.

Koledova VV , Khalil RA. (2007). Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 5, 777-89.

Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M , Guzik TJ. (2014). NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal.* 20, 2794-814.

Korach KS. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science.* 266, 1524-7.

Krämer BK, Nishida M, Kelly RA , Smith TW. (1992). Endothelins. Myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulat.* 85(1):350-6.

Kublickiene K, Svedas E, Landgren BM, Crisby M, Nahar N, Nisell H , Poston L. (2005). Small artery endothelial dysfunction in postmenopausal women: in vitro function, morphology, and modification by estrogen and selective estrogen receptor modulators. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 6113-22.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S , Gustafsson JA. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endoc.* 138, 863-70.

Kvietys PR , Granger DN. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med.* 52, 556-92.

- Lai EY, Jansson L, Patzak A , Persson AE. (2007). Vascular reactivity in arterioles from normal and alloxan-diabetic mice: studies on single perfused islets. *Diabet.* 56, 107-12.
- Lawlor DA, Lichtenstein P , Langstrom N. (2011). Association of maternal diabetes mellitus in pregnancy with offspring adiposity into early adulthood: sibling study in a prospective cohort of 280,866 men from 248,293 families. *Circ.* 123, 258-65.
- Lemieux C, Picard F, Labrie F, Richard D , Deshaies Y. (2003). The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes Res.* 11, 477-90.
- Lever AF , Harrap SB. (1992). Essential hypertension: a disorder of growth with origins in childhood? *J Hypertens.* 10, 101-20.
- Li H , Poulos TL. (2005). Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 99, 293-305.
- Li Q, Park K, Li C, Rask-Madsen C, Mima A, Qi W, Mizutani K, Huang P , King GL. (2013). Induction of vascular insulin resistance and endothelin-1 expression and acceleration of atherosclerosis by the overexpression of protein kinase C-beta isoform in the endothelium. *Circ Res.* 113, 418-27.
- Lincoln TM, Dey N , Sellak H. (2001). Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* (1985). 91, 1421-30.
- Luscher TF, Aarhus LL , Vanhoutte PM. (1990). Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J of Hypert.* 3, 55-8.
- Lusis A J. (2000). Atherosclerosis. *Nat.* 14, 233–241.

Majzunova M, Dovinova I, Barancik M , Chan JY. (2013). Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci.* 20, 69.

Makimattila S , Yki-Jarvinen H. (2002). Endothelial dysfunction in human diabetes. *Curr Diab Rep.* 2, 26-36.

Manderson JG, Mullan B, Patterson CC, Hadden DR, Traub AI , McCance DR. (2002). Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia.* 45, 991-6.

Mangelsdorf DJ , Evans RM. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83, 841-50.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P , Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 83, 835-9.

Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR , Pinton P. (2012). Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct.* 329635.

Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, Bassford T, Burke G, Torrens J, Howard BV. (2004). Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diab.* 47, 1175-87.

Marletta MA. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 268, 12231-4.

Martorell A, Sagredo A, Aras-Lopez R, Balfagon G , Ferrer M. (2009). Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta.

Card Res. 84, 300-8.

Masano T, Kawashima S, Toh R, Satomi-Kobayashi S, Shinohara M, Takaya T, Sasaki N, Takeda M, Tawa H, Yamashita T, Yokoyama M, Hirata K. (2008). Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: the possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Circ J.* 72, 1512-9.

McNally PG, Watt PA, Rimmer T, Burden AC, Hearnshaw JR, Thurston H. (1994). Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Scien (London, England : 1979).* 87, 31-6.

Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G. (2000). Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J.* 349, 353-6.

Mendelsohn ME. (2002). Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *The Am J of card.* 90, 3F-6F.

Metzger BE, Coustan DR. (1998). Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes care.* 21 Suppl 2, B161-7.

Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabet care.* 33, 676-82.

Miller VM, Duckles SP. (2008). Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev.* 60, 210-41.

- Miller VM , Mulvagh SL. (2007). Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 263-70.
- Mitanchez D, Burguet A , Simeoni U. (2014). Infants born to mothers with gestational diabetes mellitus: mild neonatal effects, a long-term threat to global health. *J Pediatr.* 164, 445-50.
- Mitanchez D, Yzydorczyk C, Siddeek B, Boubred F, Benahmed M , Simeoni U. (2015). The offspring of the diabetic mother--short- and long-term implications. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 29, 256-69.
- Miyagawa K , Emoto N. (2014). Current state of endothelin receptor antagonism in hypertension and pulmonary hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 8, 202-16.
- Moncada S, Herman AG, Higgs EA , Vane JR. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res.* 11, 323-44.
- Moncada S, Palmer RM , Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43, 109-42.
- Moon JY. (2013). Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. *Electrolyte Blood Press.* 11, 41-5.
- Morita I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostag Other Lipid Mediat.* 68-69, 165-75.
- Mullarkey CJ, Edelstein D , Brownlee M. (1990). Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Bioch and bioph res comm.* 173, 932-9.

- Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. (2002). Detection of superoxide in vascular tissue. *Arter, thromb and vasc biol.* 22, 1761-8.
- Murphy MJ, Jr. (1998). Molecular Action and Clinical Relevance of Aromatase Inhibitors. *Oncolog.* 3, 129-30.
- Nakazawa T, Kaneko Y, Mori A, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. (2007). Attenuation of nitric oxide- and prostaglandin-independent vasodilation of retinal arterioles induced by acetylcholine in streptozotocin-treated rats. *Vasc pharm.* 46, 153-9.
- Napoli C, de Nigris F, Palinski W. (2001). Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem.* 82, 674-82.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79, 1193-226.
- Naseem KM. (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 26, 33-65.
- Nassar T, Kadery B, Lotan C, Da'as N, Kleinman Y, Haj-Yehia A. (2002). Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J of Pharm.* 436, 111-8.
- Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. (2009). Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. *Diabet Care.* 32(1):193-203.
- Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. (2002). Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypert.* 39, 316-22.
- Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. (1995). Molecular mechanisms of diverse

actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1259, 109-19.

Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL , Sanchez JM. (2000). Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res*. 87, 406-11.

Nerenberg K, Daskalopoulou SS , Dasgupta K. (2014). Gestational diabetes and hypertensive disorders of pregnancy as vascular risk signals: an overview and grading of the evidence. *The Canad J of Card*. 30, 765-73.

Nickles HT , Kuebler WM. (2010). Take my breath away: perivascular fluid cuffs impair lung mechanics. *Crit Care Med*. 38, 1494-6.

Nilsson BO, Ekblad E, Heine T , Gustafsson J. (2000). Increased magnitude of relaxation to oestrogen in aorta from oestrogen receptor beta knock-out mice. *J Endocrinol*. 166, R5-9.

Okon EB, Szado T, Laher I, McManus B , van Breemen C. (2003). Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. *J Vasc Res*. 40, 520-30.

Oniki H, Fujii K, Kansui Y, Goto K , Iida M. (2006). Effects of angiotensin II receptor antagonist on impaired endothelium-dependent and endothelium-independent relaxations in type II diabetic rats. *J Hypertens*. 24, 331-8.

Orshal JM , Khalil RA. (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *Amer J of phys Regul, integr and compar physiol*. 286, R233-49.

Osmond C, Barker DJ. (2000). Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*. 108, 545-53.

Oviedo PJ, Hermenegildo C, Tarin JJ , Cano A. (2005). Raloxifene promotes prostacyclin release in human endothelial cells through a mechanism that

involves cyclooxygenase-1 and -2. *Fertil Steril*. 83, 1822-9.

Palmer RM, Ashton DS , Moncada S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333, 664-6.

Palmer RM, Ferrige AG , Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327, 524-6.

Pannirselvam M, Verma S, Anderson TJ , Triggle CR. (2002). Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. *Brit J of pharm*. 136, 255-63.

Pettersson K , Gustafsson JA. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*. 63, 165-92.

Pettitt DJ, McKenna S, McLaughlin C, Patterson CC, Hadden DR , McCance DR. (2010). Maternal glucose at 28 weeks of gestation is not associated with obesity in 2-year-old offspring: the Belfast Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) family study. *Diabet care*. 33, 1219-23.

Pimenta E , Oparil S. (2009). Role of aliskiren in cardio-renal protection and use in hypertensives with multiple risk factors. *Vasc heal and risk manag*. 5, 453-63.

Proudler AJ, Crook D, Godsland IF, Collins P, Rosano GM , Stevenson JC. (1995). Serum angiotensin-I-converting enzyme activity in women with cardiometabolic syndrome X: relation to blood pressure and lipid and carbohydrate metabolic risk markers for coronary heart disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 80, 696-9.

Pugsley MK , Tabrizchi R. (2000). The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 44, 333-40.

- Rahimi Z, Moradi M , Nasri H. (2014). A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. *J Res Med Sci.* 19, 1090-8.
- Rahimian R, Chan L, Goel A, Poburko D , van Breemen C. (2004). Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells. *Bioch and bioph res comm.* 322, 373-9.
- Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP , Xavier FE. (2012a). Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Brit J of pharm.* 166, 2198-208.
- Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP , Xavier FE. (2012b). Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PloS one.* 7, e50593.
- Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP , Xavier FE. (2012c). Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PloS one.* 7, e50593.
- Rapoport RM , Murad F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 52, 352-7.
- Regitz-Zagrosek V. (2006). Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nature reviews Drug discovery.* 5, 425-38.
- Ribeiro-Oliveira A, Jr., Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, Dos Santos RA , Simoes e Silva AC. (2008). The renin-angiotensin system and diabetes: an

update. Vasc hea and risk manag. 4, 787-803.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwat Y, Miyazakit H, Kimura S, Goto K , Masaki T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. Nature. 348, 732-35.

Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL , Bader M. (2004). Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. Physiol Genomics. 17, 292-9.

Santos RA, Ferreira AJ , Simoes ESAC. (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. Exp phys. 93, 519-27.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R , Walther T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci USA. 100, 8258-63.

Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK , Dzau VJ. (1992). Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. Bioc and bioph res comm. 185, 253-9.

Schafer A, Fraccarollo D, Pfortsch S, Flierl U, Vogt C, Pfrang J, Kobsar A, Renne T, Eigenthaler M, Ertl G , Bauersachs J. (2008). Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. Brit J of pharm. 153, 886-93.

Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S , Libby P. (1999). Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. The Am J of path. 155, 1281-91.

- Seabra G, Saunders C, de Carvalho Padilha P, Zajdenverg L, da Silva LB , de Souza Santos MM. (2015). Association between maternal glucose levels during pregnancy and gestational diabetes mellitus: an analytical cross-sectional study. *Diabetol Metab Syndr.* 7, 17.
- Segar EM, Norris AW, Yao JR, Hu S, Koppenhafer SL, Roghair RD, Segar JL , Scholz TD. (2009). Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. *Clin sci (London, England : 1979).* 117, 129-38.
- Setoguchi S, Hirooka Y, Eshima K, Shimokawa H , Takeshita A. (2002). Tetrahydrobiopterin improves impaired endothelium-dependent forearm vasodilation in patients with heart failure. *J of cardiov pharm.* 39, 363-8.
- Shadwick RE. (1999). Mechanical design in arteries. *J Exp Biol.* 202, 3305-13.
- Shemyakin A, Salehzadeh F, Esteves Duque-Guimaraes D, Bohm F, Rullman E, Gustafsson T, Pernow J , Krook A. (2011). Endothelin-1 reduces glucose uptake in human skeletal muscle in vivo and in vitro. *Diabetes.* 60, 2061-7.
- Simmons D. (2011). Diabetes and obesity in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25, 25-36.
- Simpson ER. (2003). Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86, 225-30.
- Simpson ER , Davis SR. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocr.* 142, 4589-94.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD , et al. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 15, 342-55.

- Smith WL, Garavito RM , DeWitt DL. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 271, 33157-60.
- Som S, Basu S, Mukherjee D, Deb S, Choudhury PR, Mukherjee S, Chatterjee SN , Chatterjee IB. (1981). Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental.* 30, 572-7.
- Sowers JR. (1998). Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch of int med.* 158, 617-21.
- Sowers JR. (2004). Insulin resistance and hypertension. *Am J of phys H and circ physiol.* 286, H1597-602.
- Stegemann JP, Hong H , Nerem RM. (2005). Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol* (1985). 98, 2321-7.
- Stocco C. (2012). Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* 77, 27–35.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A , Salvetti A. (1997). Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypert.* 29, 274-9.
- Takahashi K, Gbatei MA, Lam HC, O'Halloran DJ , Bloom SR. (1990). Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia.* 33, 306-10.
- Tan E, Gurjar MV, Sharma RV , Bhalla RC. (1999). Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiov res.* 43, 788-97.
- Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, Fujii J, Suzuki K , Kayanoki Y. (1996). Involvement of glycation and oxidative

stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes*. 45 Suppl 3, S81-3.

Tawfik SH, Mahmoud BF, Saad MI, Shehata M, Kamel MA , Helmy MH. (2015).

Similar and additive effects of ovariectomy and diabetes on insulin resistance and lipid metabolism. *Biochem Res Int*. 2015, 567945.

Taylor SG , Weston AH. (1988). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci*. 9, 272-4.

Tesfamariam B, Jakubowski JA , Cohen RA. (1989). Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH<sub>2</sub>-TxA<sub>2</sub>. *The Am J of physiol*. 257, H1327-33.

Thompson D, Berger H, Feig D, Gagnon R, Kader T, Keely E, Kozak S, Ryan E, Sermer M , Vinokuroff C. (2013). Diabetes and pregnancy. *Can J Diabetes*. 37 Suppl 1, S168-83.

Tsutsui M, Tanimoto A, Tamura M, Mukae H, Yanagihara N, Shimokawa H , Otsuji Y. (2015). Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *J Pharmacol Sci*. 127, 42-52.

Vane JR, Anggard EE , Botting RM. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 323, 27-36.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J , Willoughby DA. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 2046-50.

Vanhoutte P. (1993). Other endothelium-derived vasoactive factors. *Neurosurgery*.

33, 648–659.

Vanhoutte PM. (2000). Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst*. 81, 271-7.

- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH , Feletou M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 196, 193-222.
- Vina J, Gambini J, Lopez-Grueso R, Abdelaziz KM, Jove M , Borrás C. (2011). Females live longer than males: role of oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 17, 3959-65.
- Vita JA. (2011). Endothelial Function. *Circulation*. *Circulat*. 124, e906-12.
- Wagenseil JE , Mecham RP. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*. 89, 957-89.
- Watts GF , Playford DA. (1998a). Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. *Ather*. 141, 17-30.
- West NA, Crume TL, Maligie MA , Dabelea D. (2011). Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. *Diab*. 54, 504-7.
- White RE, Darkow DJ , Lang JL. (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ res*. 77, 936-42.
- Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L , Bauersachs J. (2003). Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypert*. 42, 991-6.
- Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, Maxwell C, Palmisano J, Keaney JF, Jr., Morrow JD , Vita JA. (2003). Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypert*. 42, 310-5.

- Wolff SP , Dean RT. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J.* 245, 243-50.
- Wong WT, Tian XY , Huang Y. (2013). Endothelial dysfunction in diabetes and hypertension: cross talk in RAS, BMP4, and ROS-dependent COX-2-derived prostanoids. *J of cardiov pharmac.* 61, 204-14.
- Wong WT, Wong SL, Tian XY , Huang Y. (2010). Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *J of cardiov pharmac.* 55, 300-7.
- Woodman RJ, Chew GT , Watts GF. (2005). Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy. *Drugs.* 65, 31-74.
- Wright CS, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Taveras EM, Gillman MW , Oken E. (2009). Intrauterine exposure to gestational diabetes, child adiposity, and blood pressure. *Am J Hypertens.* 22, 215-20.
- Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A , Fujimoto K. (2002). iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 33, 649-58.
- Wu R, Laplante MA , de Champlain J. (2005). Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypert.* 45, 1139-44.
- Xavier FE, Blanco-Rivero J, Sastre E, Badimon L , Balfagon G. (2010). Simultaneous inhibition of TXA(2) and PGI(2) synthesis increases NO release in mesenteric resistance arteries from cirrhotic rats. *Clin sc (London, England : 1979).* 119, 283-92.
- Xavier FE, Davel AP, Rossoni LV, Vassallo DV. (2003). Time-dependent

hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vascul Pharmacol.* 40, 67-76.

Xiong X, Saunders LD, Wang FL , Demianczuk NN. (2001). Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes. *Int J Gynaecol Obstet.* 75, 221-8.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K , Masaki T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332, 411-5.

Yessoufou A , Moutairou K. (2011). Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory". *Exper diab res.* 2011, 218598.

Zhao C, Dahlman-Wright K , Gustafsson JA. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal.* 6, e003.

Zhou MS , Schulman IH. (2009). Prevention of diabetes in hypertensive patients: Results and implications from the VALUE trial. *Vasc Health Risk Manag.* 5, 361-8.

**APÊNDICE A - Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2**

## Research Paper

# Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2

Francine Gomes de Sá, Diego Barbosa de Queiroz, Fernanda Elizabethe Ramos-Alves, Juliana Santos-Rocha, Odair Alves da Silva, Hicla Stefany Moreira, Geórgia Andrade Leal, Marcelo Aurélio da Rocha, Gloria Pinto Duarte and Fabiano Elias Xavier 

*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil*

Edited by: Maria Gomez

## New Findings

### • What is the central question of this study?

Hyperglycaemia during pregnancy induces vascular dysfunction and hypertension in male offspring. Given that female offspring from other fetal programming models are protected from the effects of fetal insult, the present study investigated whether there are sex differences in blood pressure and vascular function in hyperglycaemia-programmed offspring.

### • What is the main finding and its importance?

We demonstrated that hyperglycaemia in pregnant rats induced vascular dysfunction and hypertension only in male offspring. We found sex differences in oxidative stress and cyclooxygenase-2-derived prostanoid production that might underlie the vascular dysfunction. These differences, particularly in resistance arteries, may in part explain the absence of hypertension in female offspring born to hyperglycaemic dams.

Exposure to maternal hyperglycaemia induces hypertension and vascular dysfunction in adult male offspring. Given that female offspring from several fetal programming models are protected from the effects of fetal insult, in this study we analysed possible differences relative to sex in blood pressure and vascular function in hyperglycaemia-programmed offspring. Hyperglycaemia was induced on day 7 of gestation (streptozotocin, 50 mg kg<sup>-1</sup>). Blood pressure, acetylcholine and phenylephrine or noradrenaline responses were analysed in the aorta and mesenteric resistance arteries of 3-, 6- and 12-month-old male and female offspring. Thromboxane A<sub>2</sub> release was analysed with commercial kits and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production by dihydroethidium-emitted fluorescence. Male but not female offspring of hyperglycaemic dams (O-DR) had higher blood pressure than control animals (O-CR). Contraction in response to phenylephrine increased and relaxation in response to acetylcholine decreased only in the aorta from 12-month-old male O-DR and not in age-matched O-CR. Contractile and vasodilator responses were preserved in both the aorta and mesenteric resistance arteries from female O-DR of all ages. Pre-incubation with tempol, superoxide dismutase, indomethacin, NS-398, furegrelate or SQ29548 decreased contraction in response to phenylephrine and potentiated relaxation in response to acetylcholine in 12-month-old male O-DR aorta. In this artery,

F. G. de Sá and D. B. de Queiroz contributed equally to this work.

thromboxane A<sub>2</sub> release and O<sub>2</sub><sup>−</sup> generation were greater in O-DR than O-CR groups. In conclusion, exposure to hyperglycaemia *in utero* results in sex-specific and age-dependent hypertension. The fact that vascular function is preserved in female O-DR may in part explain the absence of hypertension in this group. In contrast, the peripheral artery dysfunction associated with increased cyclooxygenase-2-derived production of vasoconstrictor prostanoids could underlie the increased blood pressure in male O-DR.

(Received 19 October 2016; accepted after revision 23 May 2017; first published online 30 May 2017)

**Corresponding author** F. E. Xavier: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Brazil. Email: fabianoxavier@ufpe.br, fabiano.exavier@gmail.com

## Introduction

Epidemiological observations and experimental studies support the concept of fetal programming as the origin of several chronic diseases, including obesity, type 2 diabetes and hypertension. Originally, the concept of fetal programming postulated by Barker and colleagues focused on maternal undernutrition (Barker, 1995, 1998). These authors proposed that cardiovascular and metabolic diseases originate through adaptations made by the fetus when it is undernourished (Barker, 2004; Godfrey & Barker, 2001). However, other developmental insults, including maternal hyperglycaemia, also increase the risk of metabolic and cardiovascular diseases in adulthood (Simeoni & Barker, 2009). Offspring of the hyperglycaemic mothers show glucose intolerance, degraded antioxidant status (Dong *et al.* 2013), macrosomia (Yessoufou & Moutairou, 2011), dyslipidaemia (Holemans *et al.* 2000), insulin resistance, obesity (Lawlor *et al.* 2011), hypertension (Nerenberg *et al.* 2014) and vascular disorders (Holemans *et al.* 2000; Ramos-Alves *et al.* 2012a, b).

Vascular endothelial dysfunction is thought to play an important role in the development of hypertension and other cardiovascular diseases (Davel *et al.* 2011). In this sense, hyperglycaemia-programmed hypertensive rats exhibit endothelial dysfunction in both conductance and resistance vessels. Impaired endothelium-dependent vasodilatation accompanied by increased vasoconstriction were reported in the aorta, renal artery and mesenteric resistance arteries from offspring of hyperglycaemic dams (Holemans *et al.* 2000; Rocha *et al.* 2005; Porto *et al.* 2010; Ramos-Alves *et al.* 2012a, b), which have been associated with development and/or maintenance of hypertension in this model.

It has been reported that female offspring of some fetal programming models are protected from the insult during development (Kwong *et al.* 2000; Ozaki *et al.* 2001; Woods *et al.* 2005). Woods *et al.* (2005) have demonstrated that maternal undernutrition during pregnancy in rats led to sex-related hypertension, with young male offspring developing increased blood pressure earlier and to a

greater degree than did female offspring. In this model, male offspring also exhibited vascular dysfunction, unlike female offspring (Woods *et al.* 2005). These sex differences have also been observed in offspring that were exposed to hypoxia (Hemmings *et al.* 2005), glucocorticoids (Dodic *et al.* 2002) or a high-sodium diet (Vehaskari & Woods, 2005) during intrauterine life. Oestrogen seems to contribute to sex differences in these fetal programming animal models. A study by Alexander (2003) revealed that female growth-restricted offspring had normalized their blood pressure when reached the puberty. In contrast, the blood pressure in this model increased after ovariectomy, with no effect in female control offspring. Likewise, in a model of hyperglycaemia-induced fetal programming, Katkhuda *et al.* (2012) reported that exposure to short-term (7 day) maternal hyperglycaemia results in hypertension in male but not in female offspring.

Our group and others have studied various aspects of the vascular function of offspring of hyperglycaemic rats. We have demonstrated that exposure to maternal hyperglycaemia during the fetal and perinatal period produced an age-related hypertension, accompanied by endothelial dysfunction and increased contractility of mesenteric resistance arteries (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b). These vascular changes are associated with cyclooxygenase-2 (COX2) overexpression and an increase in the release of vasoconstrictor prostanoids (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b) that was abolished by angiotensin II type 1 receptor antagonism, indicating a role of angiotensin II (DB de Queiroz, FE Ramos-Alves, J Santos-Rocha, GP Duarte & FE Xavier; unpublished results). However, these studies were performed only in male offspring, without exploring how maternal hyperglycaemia influences vascular function in female offspring. Thus, we sought to extend our studies in this model to determine whether offspring exposed to maternal hyperglycaemia would display sex-specific changes in vascular function. For this purpose, we studied the endothelium-dependent relaxation and the vascular responses induced by  $\alpha$ -adrenergic receptor activation in the thoracic aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from male and female offspring of hyperglycaemic

dams. The potential mechanism of possible vascular changes was also investigated.

## Methods

### Ethical approval

All experimental protocols were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pernambuco (approval reference number: 23076.040928/2011-18). The study complied with the ethical principles under which *Experimental Physiology* operates, and the experiments complied with the journal's animal ethics principles and regulation checklist (Grundy, 2015).

### Animals

Male and female Wistar rats (250–300 g) were obtained from colonies maintained in the animal quarters of the Departamento de Fisiologia e Farmacologia of Universidade Federal de Pernambuco, campus of Recife, Brazil. Rats were housed in individually ventilated cages (425 mm × 266 mm × 185 mm; Tecniplast, Buguggiate, Italy), with three animals in each cage. The room where they were kept had a 12 h–12 h light–dark cycle, and the temperature was regulated within the range of 22–24°C. Rats had free access to tap water and standard rat chow *ad libitum*.

Three female rats (during oestrous stage of the oestrous cycle) were placed in cages with one male rat during the dark period of the cycle to mate overnight. In the morning, males and females were separated, and vaginal smears of each female were examined for the presence of sperm. The day when sperm was found in the vaginal smear was considered day 1 of gestation. Each pregnant female was transferred into a separate cage, and the weight gain was monitored throughout the pregnancy.

Pregnant rats ( $n = 16$ ) were rendered diabetic by an i.p. injection of streptozotocin [STZ; 50 mg (kg body weight)<sup>-1</sup> in 10 mmol l<sup>-1</sup> citrate buffer, pH 4.5; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA] on the 7th day of pregnancy. Pregnant rats ( $n = 14$ ) were injected with vehicle only, as a control group. To confirm the hyperglycaemia during gestation (ACCU-CHEK®; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), maternal blood was collected on day 14 of gestation from a blood sample from the tail vein. All diabetic dams included in the study had the fasting blood glucose concentrations between 250 and 500 mg dl<sup>-1</sup>.

Dams were allowed to deliver spontaneously. Rats that did not deliver were anaesthetized with ketamine 80 mg kg<sup>-1</sup> and xylazine 5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p. and killed by decapitation. After birth, each rat litter was reduced to six pups (3 males and 3 females) to ensure equal nutrient

access for all offspring and to reduce mortality. The unwanted pups were killed by CO<sub>2</sub> inhalation followed by cervical dislocation. Male and female offspring of control (O-CR) and hyperglycaemic dams (O-DR) were studied at 3, 6 and 12 months of age. Pups of both sexes were weaned on to standard rat chow on postnatal day 21. Experiments with female offspring were performed during the oestrous stage of the oestrous cycle.

### Glucose tolerance and insulin sensitivity

The oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed in 3- and 12-month-old male and female offspring according to a standard protocol. After a 10 h fast, a single oral dose [2 g (kg body weight)<sup>-1</sup>] of glucose was delivered. Blood glucose was measured from the tail vein immediately before and 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration, using test strips and a reader (ACCU-CHEK®).

After 48 h, the animals were subjected to another 10 h fast for assessment of insulin sensitivity by ITT. For this, regular insulin was administered i.p. at the dose of 1.5 U (kg body weight)<sup>-1</sup>. Blood glucose was determined before and after 15, 30, 45 and 60 min of insulin administration from a blood sample from the tail vein.

### Arterial blood pressure measurement

The arterial blood pressure was measured in the same group of animals at 3, 6 and 12 months of age (female  $n = 41$ , male  $n = 44$ ), 1 week apart from ITT. For arterial pressure measurements, male and female offspring were anaesthetized with a mixture of ketamine (80 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and xylazine (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). The adequacy of anaesthesia was assessed by monitoring withdrawal reflexes, and a supplementary dose of anaesthetic was administered when required. A polyethylene catheter (PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was inserted into the right carotid artery for direct arterial pressure measurement. The distal end of the catheter was tunnelled subcutaneously, exteriorized in the mid-scapular region and sutured to the skin, which allows the rat freedom of movement. At the end of the surgery, an i.m. injection of the analgesic and anti-inflammatory ketoprofen (5 mg kg<sup>-1</sup>; Venco Laboratory, Londrina, Brazil) was administered. Animals were allowed free access to food and water.

After a recovery period of 24 h, the pulsatile blood pressure and heart rate were recorded in conscious, freely moving rats. To perform the blood pressure recording, we used a pressure transducer (MLT0380; ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW, Australia) connected to an amplifier (Bridge Amp, ML224; ADInstruments) and an acquisition system (PowerLab 4/30, ML866; ADInstruments), and the signals were digitized with appropriate software (Chart Pro; ADInstruments). Heart

rate was derived from the pulsatile blood pressure signal. The cardiovascular parameters were recorded once for 60 min, but only the last 30 min were considered for data analysis. The measurements were performed between 14.00 and 17.00 h. To avoid possible influence of the surgical process on the vascular reactivity, these animals were not used for additional experiments. After blood pressure measurement, all animals were anaesthetized [ketamine (80 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and xylazine (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.)] and killed by decapitation.

### Vascular reactivity measurements

In a separate group of animals (female  $n = 42$ , male  $n = 45$ ), aortic and mesenteric resistance artery reactivity were assessed using methods previously described (Mulvany & Halpern, 1977). Rats were anaesthetized with ketamine (80 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and xylazine (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and killed by exsanguination. The mesenteric vascular bed and thoracic aorta were removed and placed in cold (4°C) Krebs Henseleit solution (KHS; mM: 115 NaCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 4.6 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 glucose and 0.03 EDTA).

**Mesenteric resistance arteries.** The third-order branch of the mesenteric arcade was dissected and cut into segments  $\sim 2$  mm in length. To measure isometric tension, segments of MRA were mounted between two tungsten wires (40  $\mu$ m diameter) in a small vessel chamber myograph (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) connected to an acquisition system (PowerLab 8/35; ADInstruments), as previously described (Mulvany & Halpern, 1977). After a 15 min equilibration period in oxygenated KHS (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) at 37°C and pH 7.4, segments were stretched to their optimal lumen diameter for active tension development. This was determined based on the internal circumference/wall tension ratio of the segments by setting their internal circumference,  $L_0$ , to 90% of what the vessels would have been if they were exposed to a passive tension that was equivalent to the tension produced by a transmural pressure of 100 mmHg. The internal diameter ( $I_1$ ) was determined according to the equation  $I_1 = L_1/\pi$ , using specific software for normalization of resistance arteries (DMT Normalization Module; ADInstruments).  $L_1$  represents the passive tension equivalent of 100 mmHg transmural pressure.

**Thoracic aorta.** Segments of thoracic aorta, free of fat and connective tissue, were mounted between two steel hooks in isolated tissue chambers containing gassed (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) KHS, at 37°C and pH 7.4. Segments were subjected to a tension of 1.0 g (optimal resting tension), which was re-adjusted every 15 min during a 45 min equilibration period before drug administration.

Isometric tension was recorded by using an isometric force displacement transducer (Letica TRI 201; Panlab, S.L., Barcelona, Spain) connected to an amplifier (Bridge Amp, ML119; ADInstruments) and to an acquisition system (PowerLab 8/35, ML870/P ADInstruments).

### Experimental protocols

After a 45 min equilibration period, the aorta and MRA were exposed to 75 and 120 mmol l<sup>-1</sup> KCl, respectively, to check their functional integrity. Then, concentration–response curves for acetylcholine (0.1 nmol l<sup>-1</sup> to 30  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) or sodium nitroprusside (0.1 nmol l<sup>-1</sup> to 100  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) were performed in MRA and aorta previously contracted with noradrenaline or phenylephrine, respectively, at a concentration that produced approximately 50–70% of the contraction induced by KCl in each case. After 60 min, concentration–response curves for phenylephrine (1 nmol l<sup>-1</sup> to 10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) were constructed in the thoracic aorta. In MRA, noradrenaline (10 nmol l<sup>-1</sup> to 30  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) was used to study the vasoconstriction induced by  $\alpha$ -adrenergic receptor activation because it produced responses that were more stable than those produced by phenylephrine. In certain experiments, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with a stainless-steel rod. The effectiveness of removal of the endothelium was confirmed by the absence of relaxation in response to acetylcholine (1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) in precontracted rings.

Additionally, the effects of the non-selective NO synthase inhibitor *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>), superoxide dismutase (SOD; 150 U ml<sup>-1</sup>), superoxide dismutase plus catalase (1000 U ml<sup>-1</sup>), the superoxide dismutase mimetic tempol (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>), the cyclooxygenase (COX) inhibitor indomethacin (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>), the COX2 inhibitor NS-398 (10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>), the thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) receptor (TP) antagonist SQ29548 (1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) or the TxA<sub>2</sub> synthase inhibitor (furegrelate; 10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) on concentration–response curves for acetylcholine and phenylephrine or noradrenaline were investigated. All drugs were added 30 min before generating the concentration–response curve.

### Thromboxane A<sub>2</sub> production

The production of TxA<sub>2</sub> was monitored by measuring its stable metabolite TxB<sub>2</sub>, using a specific enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Aortic rings (3–4 mm in length) were placed for 45 min (stabilization period) in 200  $\mu$ l of gassed (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) KHS at 37°C. Afterwards, three 10 min washout periods were run, and the medium (200  $\mu$ l) was collected to measure basal TxA<sub>2</sub> release.

Once the chamber was refilled, acetylcholine (0.1 nM to 3  $\mu$ M) or phenylephrine (0.1 nM to 3  $\mu$ M) was applied at 2 min intervals. At the end of each curve, the medium (200  $\mu$ l) was collected to measure the stimulated TxA<sub>2</sub> release. The different assays were performed following the manufacturer's instructions. Results were expressed as picograms per millilitre per milligram of wet tissue.

### *In situ* generation of superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>•−</sup>)

The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate *in situ* production of O<sub>2</sub><sup>•−</sup>. Frozen tissue segments were cut into 10  $\mu$ m-thick sections and placed on a glass slide. Serial sections were equilibrated in identical conditions for 30 min at 37°C in Krebs–Hepes buffer (in mmol l<sup>−1</sup>: 130 NaCl, 5.6 KCl, 2CaCl<sub>2</sub>, 0.24 MgCl<sub>2</sub>, 8.3 Hepes and 11 glucose, pH 7.4). Fresh buffer containing DHE (5  $\mu$ mol l<sup>−1</sup>) was applied topically to each tissue section, covered with a coverslip, incubated for 30 min in a light-protected humidified chamber at 37°C, and then viewed with an optical microscope (Eclipse 80i; Nikon, Japan) equipped with a rhodamine filter and camera (DS-U3; Nikon, Japan) using a  $\times 20$  objective and the same imaging settings in each case. As a negative control, parallel sections were pre-incubated with the superoxide dismutase mimetic manganese (III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin (MnTMPyP; 1  $\mu$ mol l<sup>−1</sup>). Superoxide production was quantitatively analysed with ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and expressed as total fluorescence (in arbitrary units).

### Drugs

Drugs used were noradrenaline hydrochloride, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, indomethacin, superoxide dismutase, catalase, DHE, L-NAME (all from Sigma, St Louis, MO, USA), SQ29548 and NS-398 (Cayman Chemical Company). Stock solutions of acetylcholine chloride, tempol, SOD, catalase and sodium nitroprusside were made in distilled water. Noradrenaline was dissolved in an NaCl (0.9%)–ascorbic acid (0.01% w v<sup>−1</sup>) solution. Indomethacin and SQ29548 were dissolved in ethanol. NS-398 and furegrelate were dissolved in DMSO. These solutions were kept at −20°C and appropriate dilutions made on the day of the experiment.

### Data management and statistical analysis

The relaxation responses to acetylcholine and sodium nitroprusside were expressed as the percentage of relaxation of the maximal contractile response induced by phenylephrine. Contractile responses to phenylephrine or noradrenaline were expressed as a percentage of the maximal response produced by KCl. To compare the effects of the different drugs or endothelium denudation

on the contractile responses to phenylephrine, some results were expressed as differences in the areas under the concentration–response curves (dAUC) in both the control and experimental groups. The AUCs were calculated from individual concentration–response curve plots, and the differences are expressed as the percentage of the control AUC from the corresponding control situation (GraphPad Prism Software).

All values are expressed as means  $\pm$  SD of the number of animals used in each experiment. Results were analysed using Student's unpaired *t* test or by one-way or two-way ANOVA for comparison between groups. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's *post hoc* test was used to compare individual means. A difference with *P* < 0.05 was considered significant.

## Results

### Body weight, fasting blood glucose, OGTT, ITT and arterial blood pressure

Streptozotocin-injected dams had severe hyperglycaemia on gestational day 14 compared with control dams (control 87.2  $\pm$  17.3 mg dl<sup>−1</sup> versus hyperglycaemic 411  $\pm$  75.2 mg dl<sup>−1</sup>; Student's unpaired *t* test, *P* < 0.05).

Table 1 shows that birth weight was significantly (*P* < 0.05) lower in O-DR than in O-CR rats, and this parameter remained lower for all ages studied.

Male and female O-DR and O-CR were normoglycaemic at all ages (Table 1). The OGTT was performed in male and female offspring at 3 and 12 months of age. Blood glucose concentrations were higher in both 3- (data not shown) and 12-month-old O-DR compared with O-CR at 30 min and remained increased at all the time points (Fig. 1A). Results from the ITT demonstrated significant insulin resistance among male and female O-DR, as they presented high blood glucose at 30, 45 and 60 min after insulin injection (Fig. 1B).

As previously demonstrated (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b), 6- and 12-month-old male O-DR presented higher blood pressure compared with age-matched O-CR (Fig. 1C). However, arterial pressure of female O-DR was similar to that of their respective age-matched O-CR (Fig. 1C). The heart rate was similar in all tested groups (data not shown).

### Vascular reactivity study

**Mesenteric resistance arteries.** Potassium chloride (75 mmol l<sup>−1</sup>) evoked similar contractions in vessels from both female O-DR and O-CR in all age groups (data not shown). In female offspring, acetylcholine-induced relaxation was similar in 3-, 6- and 12-month-old O-DR compared with age-matched O-CR (Fig. 2A, B

**Table 1.** Mean values for body weight and fasting glucose of 3-, 6- and 12-month-old male and female offspring of control (O-CR) and hyperglycaemic (O-DR) rats

| Parameter                            | Female      |              | Male        |              |
|--------------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
|                                      | O-CR        | O-DR         | O-CR        | O-DR         |
| Body weight (g)                      |             |              |             |              |
| At birth                             | 6.14 ± 0.94 | 4.93 ± 0.74* | 7.65 ± 0.87 | 5.91 ± 0.91* |
| 3 months                             | 216 ± 4.20  | 187 ± 5.54*  | 302 ± 38.5  | 284 ± 41.2*  |
| 6 months                             | 245 ± 14.1  | 219 ± 5.44*  | 418 ± 29.7  | 371 ± 27.8*  |
| 12 months                            | 281 ± 13.3  | 261 ± 8.05*  | 465 ± 42.4  | 441 ± 21.4*  |
| Blood glucose (mg dl <sup>-1</sup> ) |             |              |             |              |
| 3 months                             | 96.2 ± 13.4 | 96.1 ± 10.3  | 98.5 ± 14.3 | 97.1 ± 11.9  |
| 6 months                             | 85.5 ± 21.0 | 93.5 ± 4.61  | 92.8 ± 9.13 | 94.5 ± 7.43  |
| 12 months                            | 79.5 ± 24.9 | 84.5 ± 19.3  | 95.1 ± 8.11 | 94.5 ± 21.8  |

Results are expressed as means ± SD. ANOVA (one-way):  $P < 0.05$  versus age-matched O-CR.

and C, respectively). Vasoconstriction in response to noradrenaline in MRA from female O-DR also remained unmodified compared with O-CR, in all age groups (Fig. 2D, E and F, respectively). The response to sodium nitroprusside was similar in MRA from all groups (data not shown).

Vasoconstriction in response to noradrenaline was increased to a similar extent by removal of the endothelium or incubation with L-NAME in MRA from female O-DR and O-CR (data not shown). In arteries from both female O-DR and O-CR, responses to acetylcholine and noradrenaline remained unmodified in the presence of indomethacin (Table 2).

**Aorta.** Potassium chloride (75 mmol l<sup>-1</sup>) evoked similar contractions in vessels from all evaluated groups studied (data not shown). Endothelium-dependent vasodilatation in response to acetylcholine was assessed in the isolated aorta from male and female O-CR and O-DR, at 3, 6 and 12 months of age. In the aorta from 3-, 6- and 12-month-old female O-DR, relaxation in response to acetylcholine was similar compared with age-matched female O-CR (Fig. 3). In male offspring, the response to acetylcholine was impaired only in 12-month-old O-DR compared age-matched O-CR (Fig. 4). There were no differences in the relaxation response induced by sodium nitroprusside in aortic rings from both male and female O-DR and O-CR (data not shown).

Phenylephrine-induced vasoconstriction was similar in female O-DR aorta compared with O-CR aorta, in all ages studied (Fig. 3). In male offspring, while phenylephrine-induced contraction remained unmodified in the aorta from 3- and 6-month-old O-DR (Fig. 4D and E), in 12-month-old O-DR aorta this response was increased when compared with age-matched O-CR (Fig. 4F).

As the changes in vascular reactivity were detected only in the aorta from male 12-month-old O-DR, the

mechanisms of these changes were investigated at this age and were compared with female age-matched offspring.

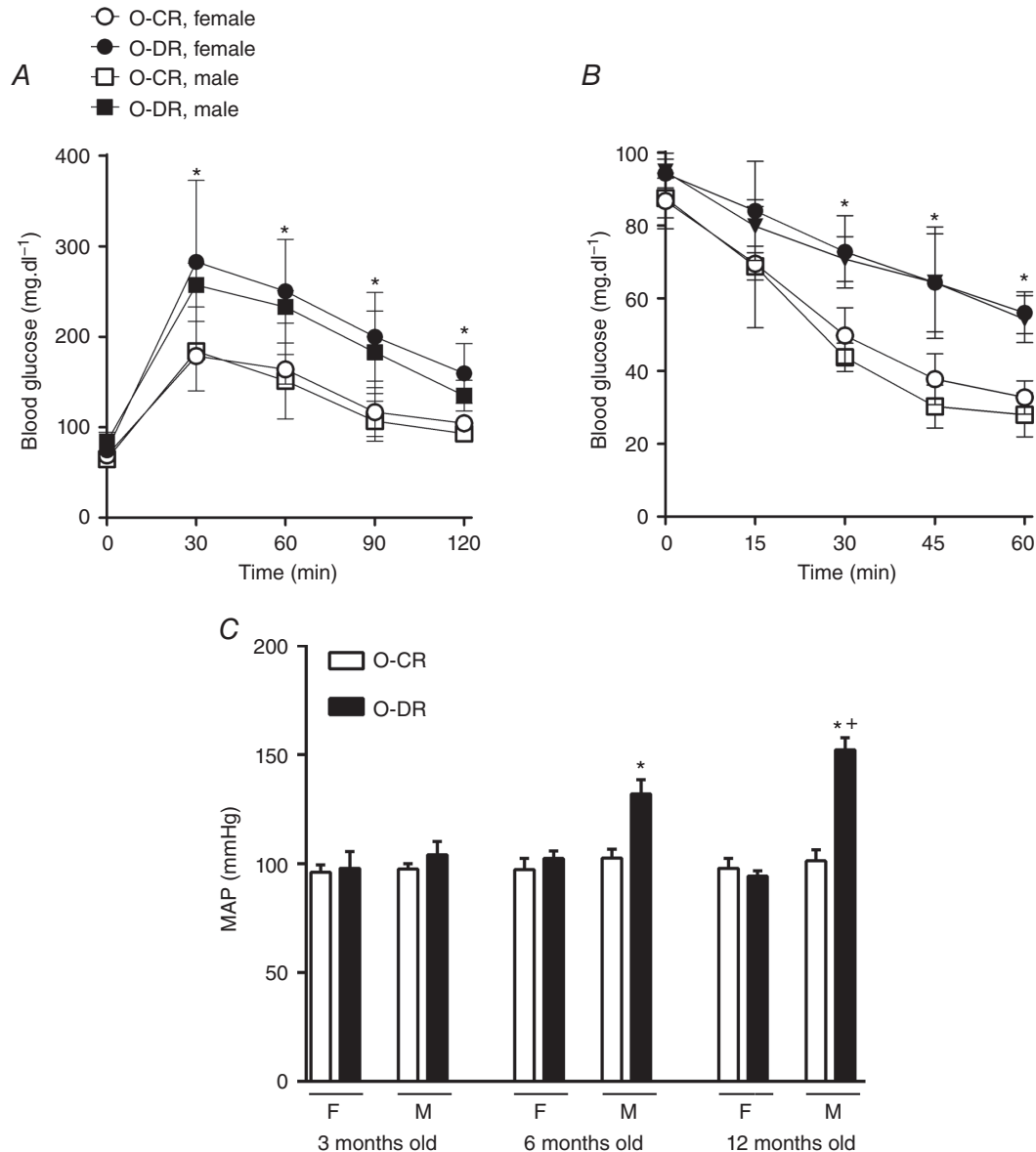
In the aorta from both 12-month-old male and female offspring, removal of the endothelium or pre-incubation with L-NAME increased vasoconstriction in response to phenylephrine to a similar extent. The comparisons are depicted in Fig. 5. The vasoconstrictor buffering capacity of endothelium/nitric oxide was significantly less in male O-DR than in all other groups (see dAUC graphs in Fig. 5).

The involvement of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and hydrogen peroxide on changes observed in acetylcholine-induced relaxation was investigated. Superoxide dismutase or the permeable SOD mimetic tempol increased acetylcholine responses in aortic rings from male O-DR (Fig. 6A), but not in O-CR [maximum response attributed to the drug ( $E_{\max}$ ), 64.6 ± 11.5% (before tempol) versus 65.7 ± 10.8% (after tempol),  $P > 0.05$ ; potency of the drug (pD<sub>2</sub>), 7.18 ± 0.14 (before tempol) versus 7.19 ± 0.15 (after tempol),  $P > 0.05$ ]. The co-incubation of catalase plus SOD produced no additional effect on relaxation in response to acetylcholine in the aorta from male O-DR (Fig. 6A). In the aorta from female O-DR (Fig. 6C) and O-CR [ $E_{\max}$ , 79.9 ± 13.5% (before tempol) versus 82.7 ± 15.9% (after tempol),  $P > 0.05$ ; pD<sub>2</sub>, 7.44 ± 0.27 (before tempol) versus 7.37 ± 0.19 (after tempol),  $P > 0.05$ ], relaxation in response to acetylcholine remained unmodified in the presence of tempol. The effect of SOD, tempol and SOD plus catalase on phenylephrine-induced vasoconstriction was also analysed. In female O-DR (Fig. 6D) and O-CR [ $E_{\max}$ , 78.5 ± 14.6% (before tempol) versus 80.7 ± 15.1% (after tempol),  $P > 0.05$ ; pD<sub>2</sub>, 6.58 ± 0.19 (before tempol) versus 6.51 ± 0.21 (after tempol),  $P > 0.05$ ], phenylephrine-induced vasoconstriction was not modified by tempol. In contrast, the altered response to phenylephrine was normalized by SOD or tempol in the aorta from male O-DR (Fig. 6B). In this group, catalase produced no additional effect on relaxation in response to acetylcholine in the presence of SOD.

Incubation with the COX inhibitor indomethacin or the selective COX2 inhibitor NS-398 increased relaxation in response to acetylcholine in aortic rings from male O-DR (Fig. 7A), but not in O-CR (data not shown). In female O-DR aorta, this response remained unaltered in the presence of indomethacin (Fig. 7C). Likewise, COX1 and COX2 inhibition decreased phenylephrine-induced vasoconstriction in male O-DR aorta (Fig. 7B), but not

in male O-CR (data not shown) or female O-DR aorta (Fig. 7D).

To analyse the contribution of  $\text{TxA}_2$  to the acetylcholine and phenylephrine responses, the aorta from male O-DR was incubated with the TP receptor antagonist SQ29548 or the  $\text{TxA}_2$  synthase inhibitor, furegrelate. In these arteries, SQ29548 or furegrelate increased relaxation in response to acetylcholine (Fig. 8A) and decreased the vasoconstrictor



**Figure 1.** Glucose (A) and insulin tolerance tests (B) in 12-month-old male and female offspring of control (O-CR) and hyperglycaemic (O-DR) rats. C, Mean arterial pressure (MAP) from 3-, 6- and 12-month-old male (M) and female (F) O-CR and O-DR

Oral glucose tolerance test (A) and insulin tolerance test (B) performed at 12 months of age in male and female offspring of control (O-CR) and hyperglycaemic (O-DR) rats. C, resting mean arterial pressure (MAP) from 3-, 6- and 12-month-old male (M) and female (F) O-CR and O-DR. Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 7$  or 8 rats. One-way ANOVA:  $*P < 0.05$  compared with age-matched O-CR;  $^{+}P < 0.05$  compared with 3- and 6-month-old male O-DR.

**Table 2.** Effect of indomethacin on  $E_{\max}$  (expressed as a percentage of the response to 75 mmol l<sup>-1</sup> KCl) and  $pD_2$  to noradrenaline and acetylcholine of mesenteric resistance arteries from 3-, 6- and 12-month-old female offspring of control (O-CR) and hyperglycaemic (O-DR) rats

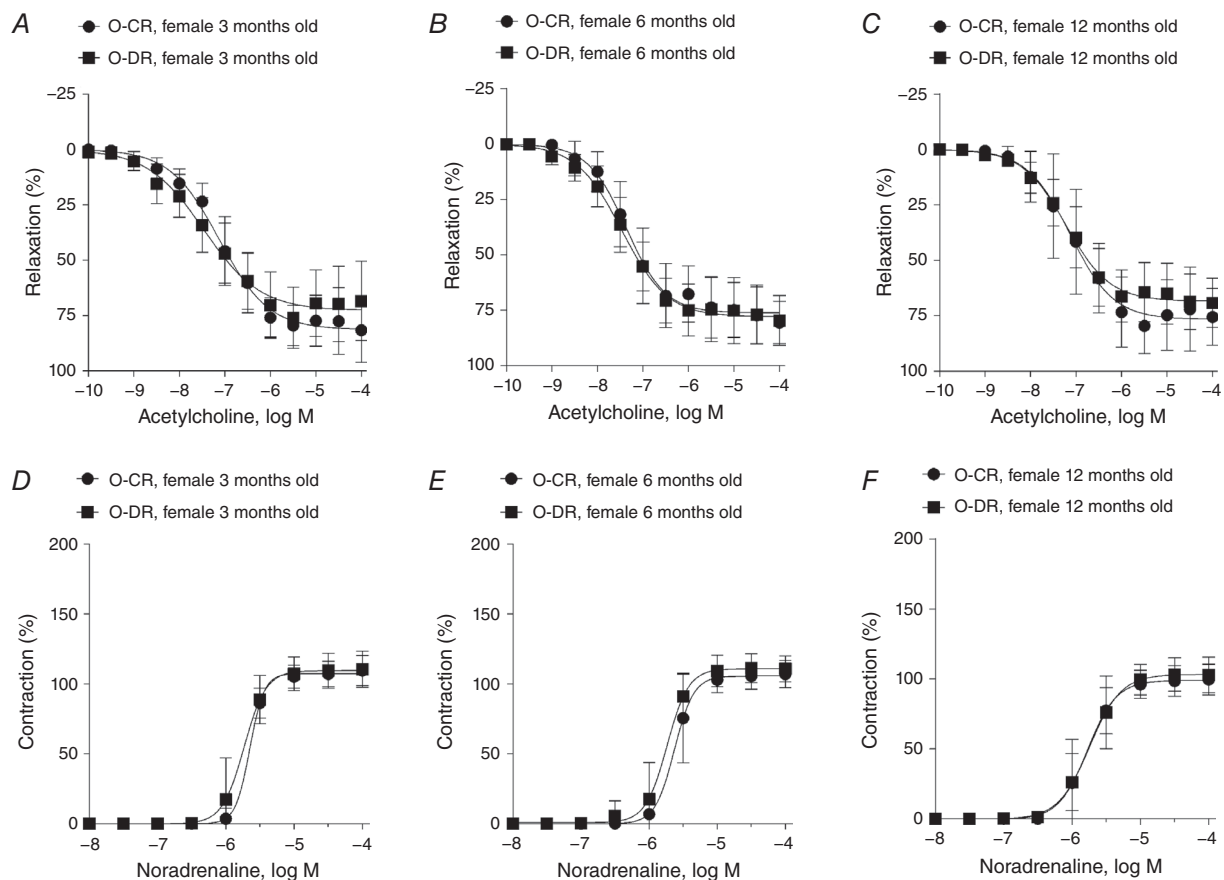
| Group              | Control        |             |                |             | Indomethacin   |             |                |             |
|--------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|
|                    | Acetylcholine  |             | Noradrenaline  |             | Acetylcholine  |             | Noradrenaline  |             |
|                    | $E_{\max}$ (%) | $pD_2$      | $E_{\max}$ (%) | $pD_2$      | $E_{\max}$ (%) | $pD_2$      | $E_{\max}$ (%) | $pD_2$      |
| O-CR 3 months old  | 82.1 ± 12.5    | 7.12 ± 0.43 | 107 ± 6.21     | 5.64 ± 0.06 | 83.3 ± 13.1    | 7.15 ± 0.14 | 102 ± 16.8     | 5.57 ± 0.24 |
| O-DR 3 months old  | 72.5 ± 15.2    | 7.46 ± 0.62 | 109 ± 10.4     | 5.73 ± 0.09 | 75.5 ± 10.6    | 7.37 ± 0.14 | 100 ± 11.9     | 5.69 ± 0.30 |
| O-CR 6 months old  | 76.8 ± 10.8    | 7.36 ± 0.38 | 106 ± 10.5     | 5.62 ± 0.09 | 79.4 ± 15.8    | 7.56 ± 0.24 | 108 ± 15.0     | 5.71 ± 0.21 |
| O-DR 6 months old  | 78.9 ± 10.7    | 7.46 ± 0.38 | 110 ± 14.0     | 5.79 ± 0.06 | 75.5 ± 15.3    | 7.51 ± 0.57 | 102 ± 21.5     | 5.72 ± 0.24 |
| O-CR 12 months old | 76.9 ± 11.7    | 7.13 ± 0.48 | 100 ± 14.2     | 5.77 ± 0.12 | 79.0 ± 15.6    | 7.23 ± 0.43 | 109 ± 19.8     | 5.69 ± 0.27 |
| O-DR 12 months old | 70.9 ± 10.2    | 7.22 ± 0.43 | 103 ± 12.3     | 5.75 ± 0.09 | 75.7 ± 8.13    | 7.28 ± 0.24 | 105 ± 17.3     | 5.69 ± 0.30 |

Results are expressed as means ± SD ( $n = 7$  or  $8$  in each group).  $E_{\max}$ , maximum response attributed to the drug;  $pD_2$ , potency of the drug. It is equivalent to the  $-\log EC_{50}$  (the drug concentration producing 50% of the maximum response).

response to phenylephrine. This effect was similar to that produced by NS-398 (compare Fig. 7A and 7B with Fig. 8A and 8B). Pre-incubation with SQ29548 or furegrelate did not affect the response to acetylcholine or phenylephrine in the aorta from male O-CR or female O-CR and O-DR (data not shown).

### Thromboxane A<sub>2</sub> release

In the aorta from male O-DR and O-CR, acetylcholine or phenylephrine increased TxA<sub>2</sub> release (Fig. 8C and D). For both stimuli, TxB<sub>2</sub> concentrations were higher in the aorta from O-DR compared with O-CR (Fig. 8C and D).



**Figure 2.** Concentration–response curves for acetylcholine (A–C) and noradrenaline (D–F) in mesenteric resistance arteries from 3-, 6- and 12-month-old female O-CR and O-DR. Results are expressed as means ± SD,  $n = 7$  or  $8$  rats. Results were analysed by two-way ANOVA.

## Superoxide production

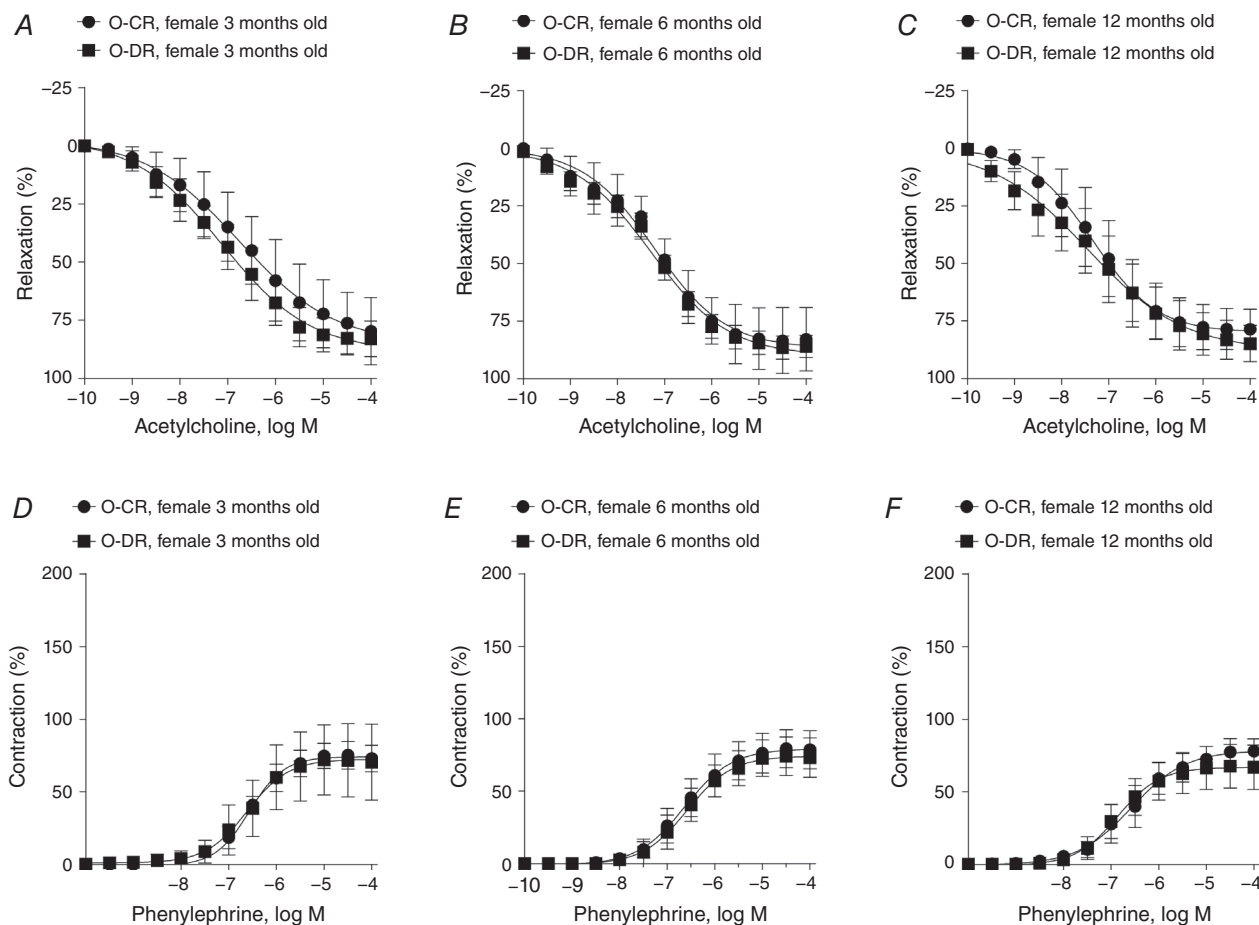
As seen in Fig. 9, the intensity of fluorescence emitted by DHE was increased in the aorta from male O-DR when compared with O-CR, indicating an increased  $O_2^-$  generation.

## Discussion

The results presented here demonstrate that, in rats, maternal exposure to hyperglycaemia leads to high blood pressure and vascular dysfunction in male but not in female offspring. Male O-DR showed an age-dependent decline of aortic endothelial function, which was characterized by impaired relaxation in response to acetylcholine and increased vasoconstriction in response to phenylephrine at 12 months of age. These changes were associated with enhanced COX2-derived  $TxA_2$  release and decreased NO bioavailability attributable to increased  $O_2^-$  generation. Preservation of vascular function of female

O-DR, particularly in resistance arteries, may in part explain the lack of hypertension in this group.

It was observed in previous studies from our group (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b), in agreement with other studies (Nehiri *et al.* 2008), that male O-DR were hypertensive from 6 months of age, which became progressively worse with the age. However, in the present study, using the same fetal programming model, we observed that 3-, 6- and 12-month-old female O-DR were normotensive compared with age-matched O-CR, suggesting a sex-specific increase of blood pressure in offspring of diabetic dams. Sex-specific hypertension has also been reported in other fetal programming models. Maternal undernutrition (Ozaki *et al.* 2001; Woods *et al.* 2005), uteroplacental insufficiency (Hemmings *et al.* 2005), exposure to glucocorticoids (Dodici *et al.* 2002) or a high-sodium diet (Vehaskari & Woods, 2005) results into hypertension among male offspring but not among the female group. The aetiology of these sex differences is unclear, but could involve differences

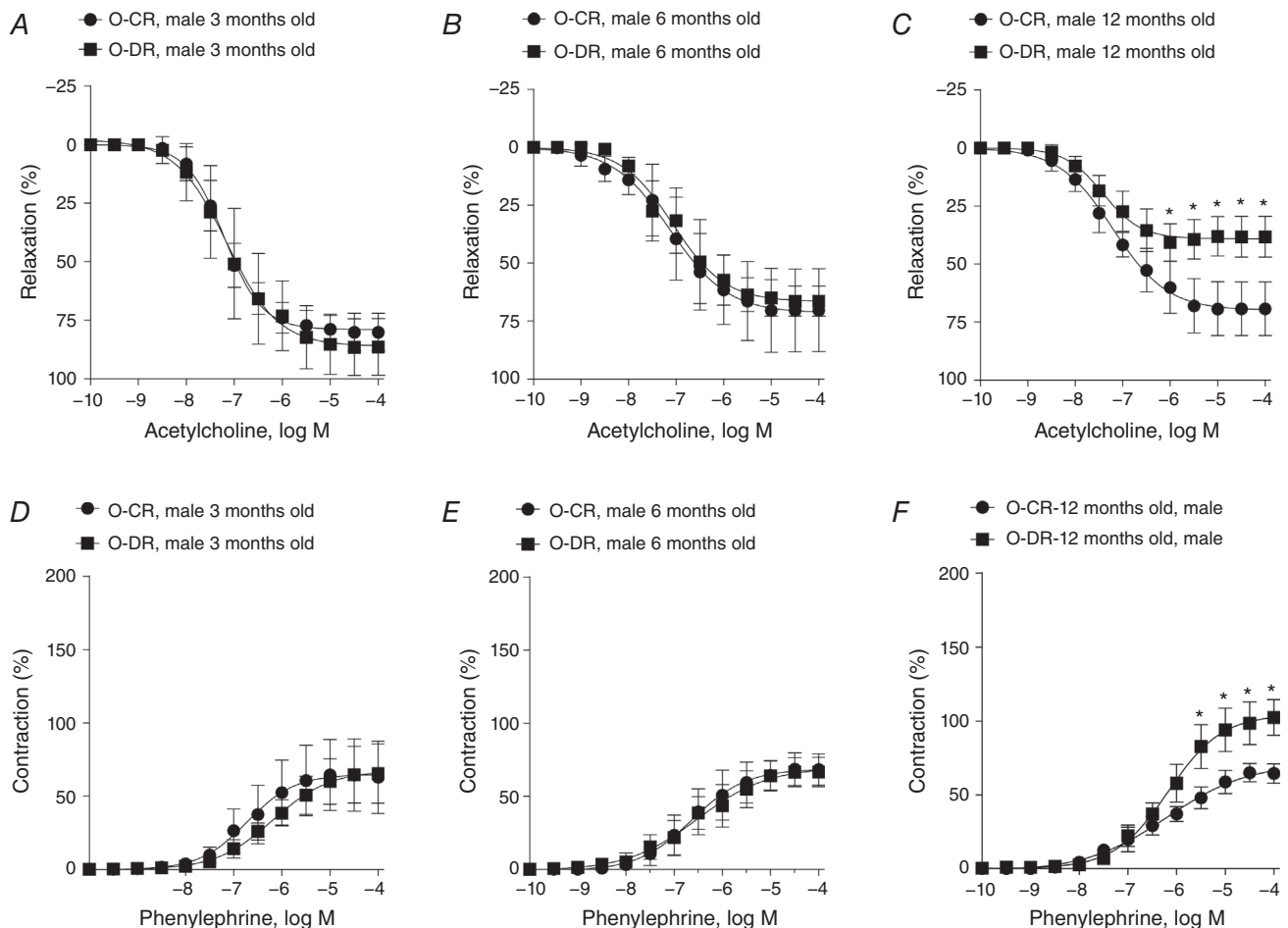


**Figure 3.** Concentration–response curves for acetylcholine (A–C) and phenylephrine (D–F) in the aorta from 3-, 6- and 12-month-old female O-CR and O-DR. Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 7$  or 8 rats. Results were analysed by two-way ANOVA.

in the amount of sex hormones. As demonstrated by Alexander (2003), female growth-restricted offspring had normalized blood pressure when they reached the puberty. In addition, when these offspring were ovariectomized, the blood pressure increased, an effect that was absent in female offspring of control dams (Alexander, 2003). Additionally, Intapad *et al.* (2013) demonstrated that aged female growth-restricted offspring exhibit increased blood pressure associated with cessation of oestrous cycles and increased testosterone concentrations.

We have previously reported (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b) that resistance arteries from male O-DR presented endothelial dysfunction signals that were already evident at 3 months of age and progressed up to 12 months of age. This was characterized by decreased vasodilatation in response to acetylcholine and by an endothelium-dependent hyperactivity to noradrenaline in MRA. Insulin resistance commonly coexists with

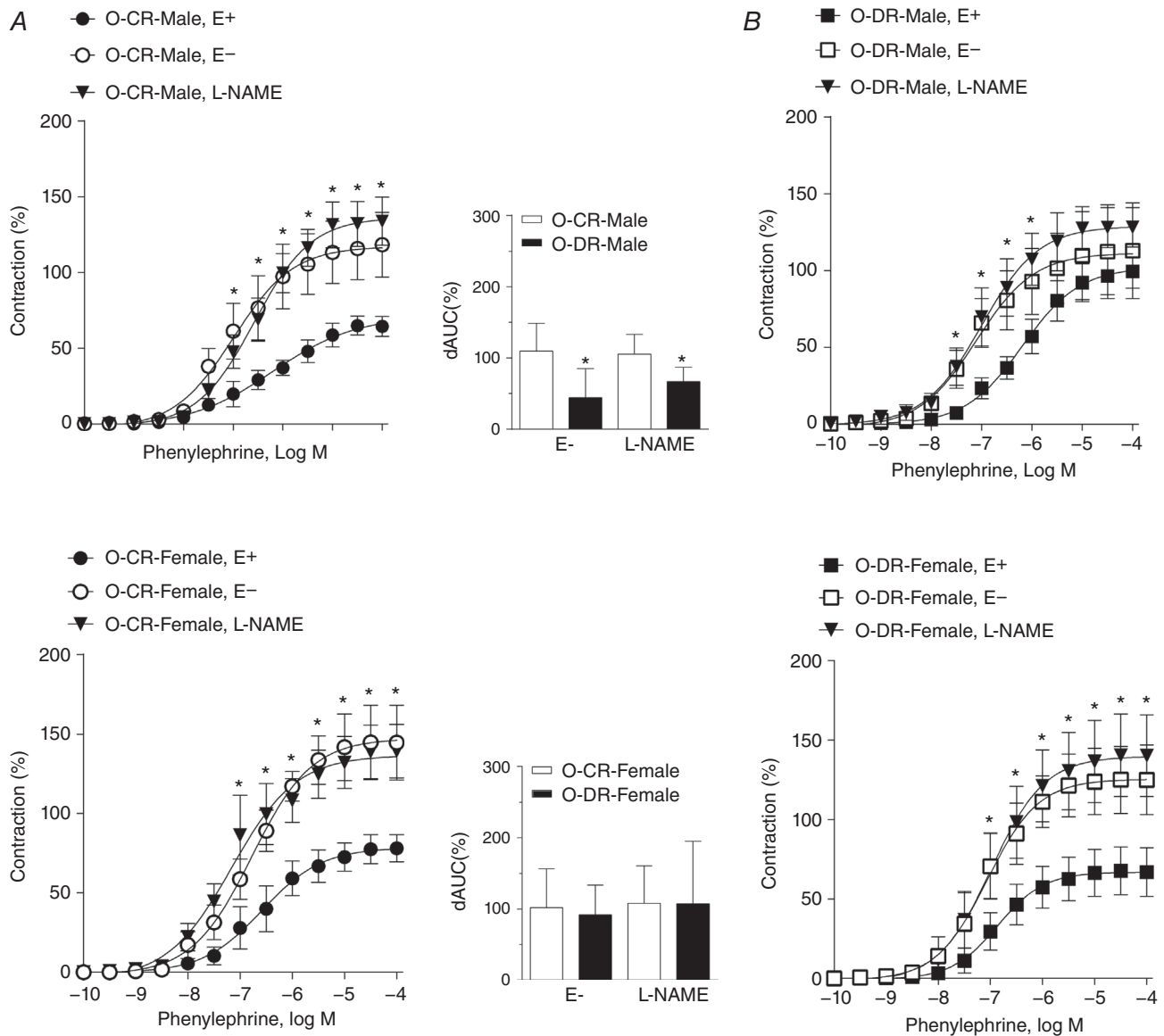
endothelial dysfunction in some cardiovascular diseases (Prieto *et al.* 2014). Blunted endothelium-derived NO is believed to be the primary defect that links these two processes. Nitric oxide deficiency results from decreased synthesis and/or release in combination with decreased bioavailability attributable to increased generation of reactive oxygen species (ROS). Insulin resistance also leads to vasoconstriction and inflammation, which occasionally produce hypertension (Chahwala & Arora, 2009). According to our previous reports (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b), male offspring of hyperglycaemic rats were insulin resistant and showed impaired endothelial function, which may be associated with the genesis and/or maintenance of hypertension in these animals. Here, despite marked differences in insulin resistance relative to those in O-CR, no feasible evidence of impaired endothelial function or increased vasoconstriction in female O-DR MRA could be found. Considering that



**Figure 4.** Concentration-response curves for acetylcholine (A–C) or phenylephrine (D–F) in the aorta from 3-, 6- and 12-month-old male O-CR and O-DR. Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 7$  or 8 rats. Results were analysed by two-way ANOVA,  $*P < 0.05$  compared with O-CR.

mesenteric resistance vessels play a pivotal role in the regulation of vascular resistance (Christensen & Mulvany, 1993), the absence of vascular changes in MRA from female O-DR may explain, at least in part, the lack of hypertension in this group. It is unclear what accounts for this protection. However, an influence of sex hormones on insulin sensitivity, endothelial function and blood pressure control has been suggested. In this sense, Vasudevan *et al.* (2005) have shown that the endothelial dysfunction and hypertension following insulin resistance

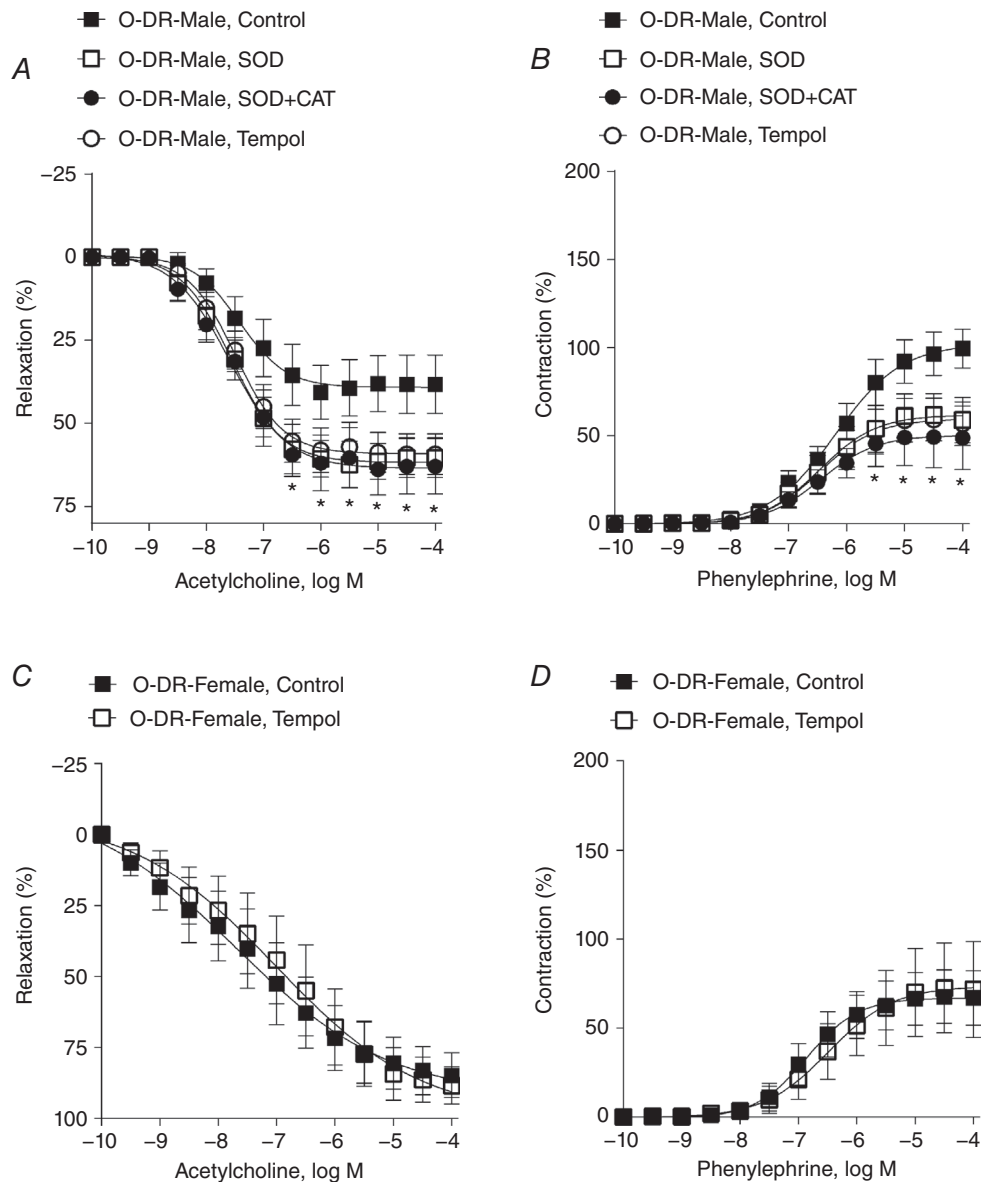
develop only in the presence of testosterone. Additionally, testosterone is indicated to provide a pro-hypertensive effect by various fetal programming models, whereas oestrogen is suggested to act as an anti-hypertensive agent. Another mechanism that may explain the absence of hypertension in female O-DR is the intact baroreflex function (Katkuda *et al.* 2012). In male offspring of hyperglycaemic dams, impaired baroreflex function has been suggested as a potential mechanism to increased blood pressure in these animals (Wichi *et al.* 2005).



**Figure 5.** Effects of removal of the endothelium or pre-incubation with L-NAME on phenylephrine-induced contraction in the aorta from 12-month-old male (A,B) and female (C,D) O-CR and O-DR. The inset graph shows differences in the area under the curve (dAUC) in the absence (E-) or presence of endothelium (E+) or L-NAME; dAUC values are expressed as arbitrary units. Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 6-8$  rats. Results were analysed by two-way ANOVA,  $*P < 0.05$  male/female E-/L-NAME versus male/female E+.

Our data also reveal differences in the vascular reactivity of conductance arteries between male and female O-DR. In female O-DR aorta, the responses to acetylcholine and phenylephrine remained unmodified at 3, 6 and 12 months compared with age-matched O-CR. In contrast, in male O-DR, although no differences were detected at 3 and 6 months, evidence of endothelial dysfunction was found in 12-month-old O-DR aorta. In this group, decreased relaxation in response to acetylcholine and increased vasoconstriction in response to phenylephrine

were observed. Comparing these results with those observed by Ramos-Alves *et al.* (2012a, b) in MRA, it is possible to suggest that thoracic aorta is 'more resistant' to the effects of fetal programming induced by hyperglycaemia. On the contrary, resistance vessels are more susceptible to this developmental insult, which in turn might contribute to increase in peripheral vascular resistance and blood pressure in male O-DR. In both arteries from male and female O-DR, the vasodilator response to the NO donor sodium nitroprusside was

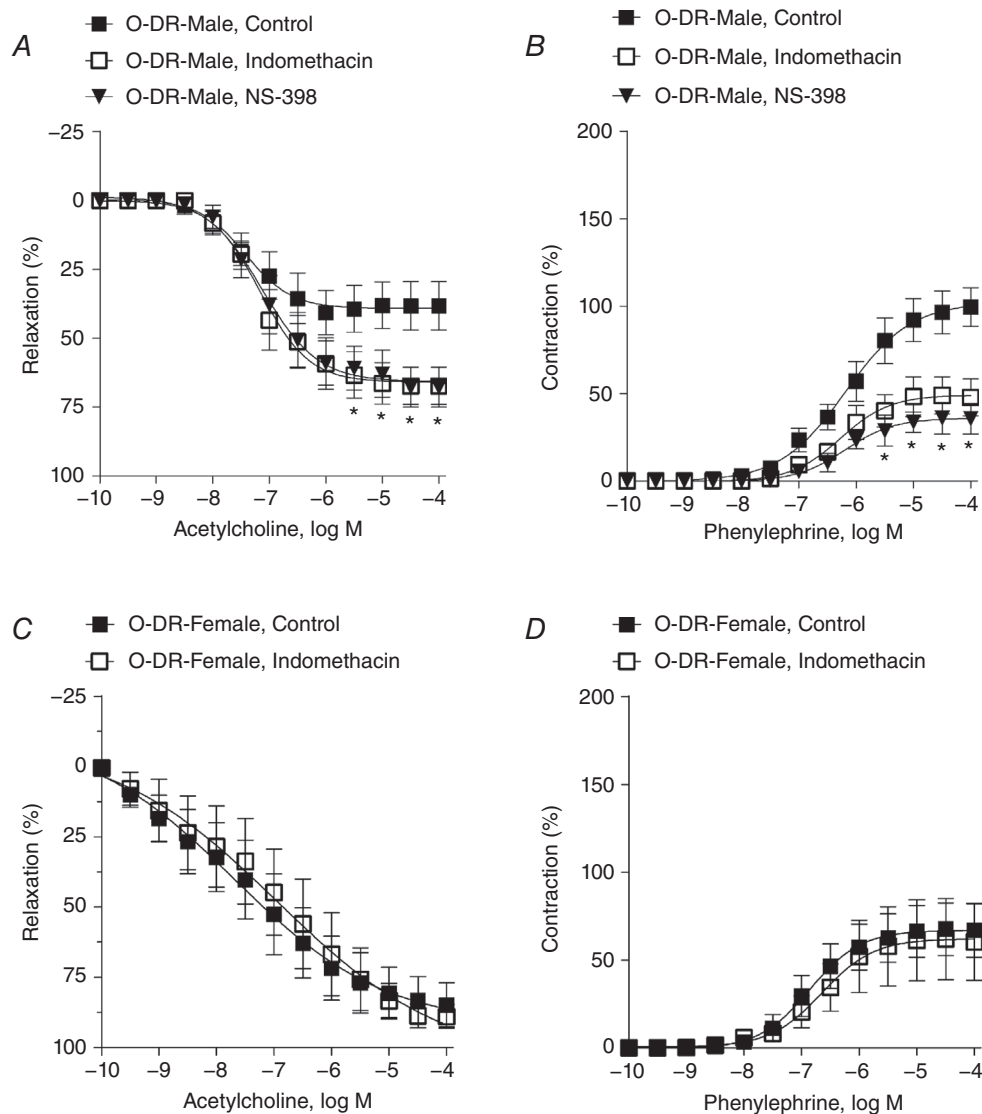


**Figure 6.** Effects of superoxide dismutase (SOD), SOD plus catalase (CAT) or tempol on acetylcholine-induced relaxation (A and C) or phenylephrine-induced contraction (B and D) in the aorta from 12-month-old male (A and B) and female (C and D) O-DR. Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 6-8$  rats. Results were analysed by two-way ANOVA, \* $P < 0.05$  SOD or SOD + CAT or tempol versus control.

similar, indicating that altered acetylcholine-induced vasodilatation is not attributable to a decreased NO vasodilator response.

Given that modifications in vascular reactivity were detected only in 12-month-old male O-DR aorta, our further objective was to elucidate the potential mechanisms of altered acetylcholine and phenylephrine responses in this group. First, we evaluated possible quantitative or qualitative differences in the participation of endothelial factors in the contractile responses to phenylephrine in both O-CR and O-DR. Both removal of the endothelium and NO synthase inhibition (L-NAME)

produced smaller increases in vasoconstriction in response to phenylephrine in male O-DR than O-CR. This suggests a decrease in NO release or bioavailability in male O-DR aorta, which in turn could contribute to the augmented phenylephrine-induced vasoconstriction in these rats. Increased  $O_2^-$  generation, leading to a decrease in NO bioavailability, has been reported in several cardiovascular diseases, including hypertension, diabetes and obesity (Davel *et al.* 2011). Bearing this in mind, we analysed the functional participation of  $O_2^-$  in the vasoconstrictor response to phenylephrine in O-CR and O-DR aorta. Pre-incubation with SOD or the permeable

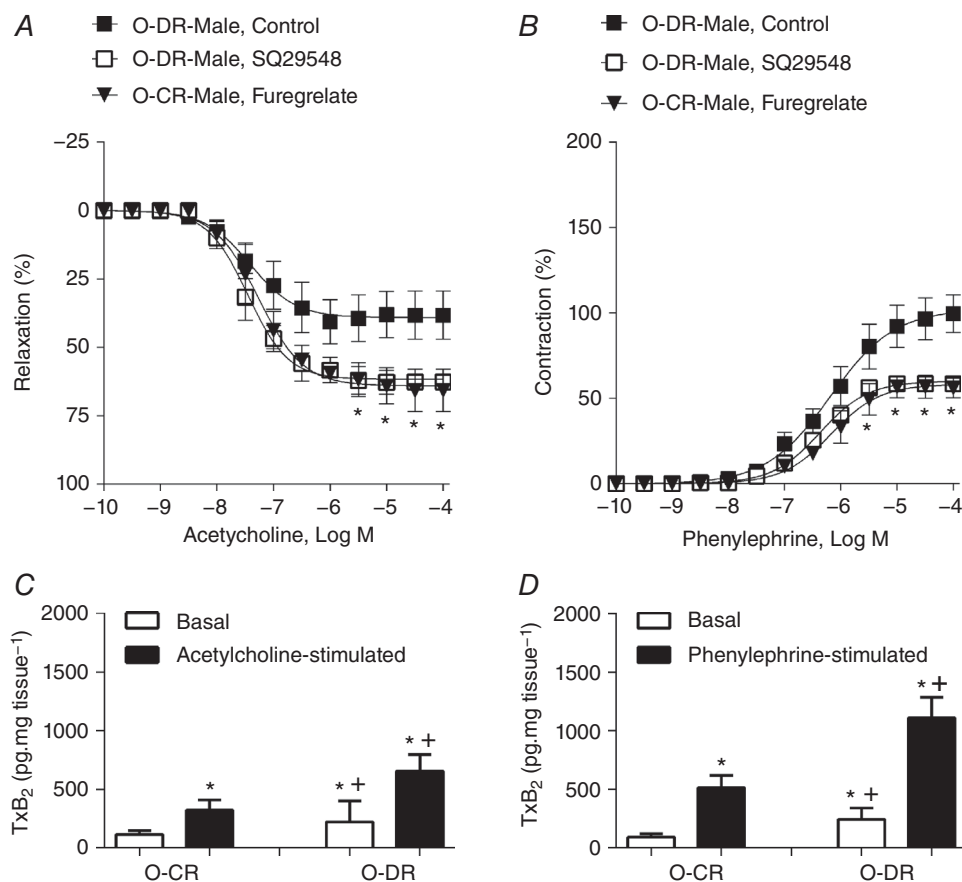


**Figure 7.** Effects of indomethacin (a COX inhibitor) or NS-398 (a COX2 inhibitor) on acetylcholine-induced relaxation (A and C) or phenylephrine-induced contraction (B and D) in the aorta from 12-month-old male (A and B) and female (C and D) O-DR. Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 6$ –8 rats. Results were analysed by two-way ANOVA, \* $P < 0.05$  indomethacin or NS-398 versus control.

SOD mimetic tempol decreased the contractile response to phenylephrine in aorta from O-DR. Furthermore, in O-DR aorta the relaxation in response to acetylcholine was potentiated in the presence of SOD or tempol. Taken together, these results indicate that oxidative stress in male O-DR aorta redirected NO-dependent relaxation to  $O_2^-$ -dependent vasoconstriction. In line with these functional results, the *in situ* detection of  $O_2^-$  was significantly higher in O-DR aorta, reinforcing the hypothesis of endothelial dysfunction by increased local oxidative stress. As previously reported (Arun *et al.* 2004; Leo *et al.* 2011), tempol did not affect relaxation or contractile responses of O-CR aorta, implying that  $O_2^-$  has an undetectable effect on vascular reactivity in control offspring aorta. Additionally, catalase did not induce any additional effect on SOD-treated aorta, ruling out a functional role of  $H_2O_2$  in the observed vascular alterations in O-DR. Reactive oxygen species are also implicated in several physiological and pathophysiological

processes in vascular smooth muscle, such as contraction, growth, differentiation, migration, release of pro-inflammatory cytokines and apoptosis (Touyz, 2004). Therefore, although not analysed in the present study, a potential deleterious effect of  $O_2^-$  on vascular smooth muscle cells from male O-DR cannot be discounted.

In female O-DR aorta, the potentiation of phenylephrine-induced vasoconstriction by removal of the endothelium or L-NAME was comparable to that obtained in female O-CR. In these groups, pre-incubation with tempol did not affect responses to acetylcholine or phenylephrine, indicating that the vascular function of female offspring is protected from oxidative damage induced by exposure to maternal hyperglycaemia. This effect is not completely understood; however, some evidence indicates that modulation of oxidant status by sex hormones may contribute to the differential programming of cardiovascular risk in male and female offspring (Ojeda *et al.* 2012; Xiao *et al.* 2013).



**Figure 8.** Effects of furegrelate or SQ29548 on acetylcholine (A) and phenylephrine responses (B) in aorta from 12-month-old male O-DR. Basal and acetylcholine- (C) or phenylephrine-stimulated (D) thromboxane B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) release in aorta from 12-month-old male O-CR and O-DR

Results are expressed as means  $\pm$  SD,  $n = 6-8$  rats. Acetylcholine and phenylephrine curves were analyzed by two-way ANOVA,  $*P < 0.05$  SQ29548/furegrelate versus control. Results of TxA<sub>2</sub> release were analyzed by one way ANOVA,  $*P < 0.05$  versus basal;  $+P < 0.05$  versus O-CR.

In addition to NO, endothelial cells can release several contraction-inducing prostanoids that modulate endothelium-dependent relaxation and contraction in response to  $\alpha$ -adrenergic receptor activation, at least in certain conditions (Tsfamariam *et al.* 1989; Xavier *et al.* 2008; Ramos-Alves *et al.* 2012a, b). Thus, the effect of indomethacin (a COX1/2 inhibitor) or NS-398 (a selective COX2 inhibitor) on acetylcholine and phenylephrine responses was analysed in the aorta from male O-CR and O-DR. Indomethacin or NS-398 increased the acetylcholine-induced relaxation and decreased the vasoconstriction in response to phenylephrine only in male O-DR aorta with similar potencies, apparently indicating the participation of vasoconstrictor COX2-derived prostanoids in these responses.

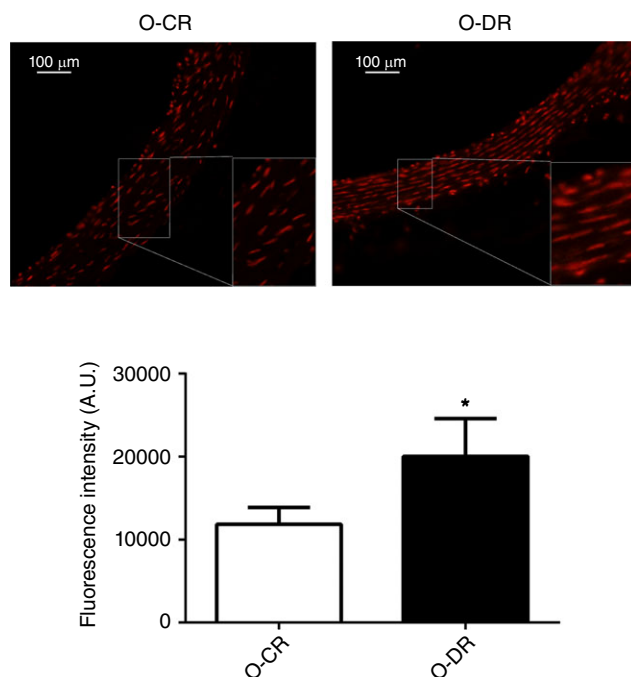
Activation of the TP receptor is one of the most important pathways that contributes to COX-mediated endothelial dysfunction in different cardiovascular risk factors (Xavier *et al.* 2008; Félétou *et al.* 2011; Ramos-Alves *et al.* 2012a, b). In the present study, incubation with SQ29548 (a TP receptor antagonist)

increased acetylcholine-induced relaxation and reduced the contraction in response to phenylephrine in male O-DR aorta. This effect was similar to that produced by indomethacin or NS-398, suggesting a role for TP receptor activation as the main mechanism of the COX2-mediated endothelial dysfunction in the aorta of male O-DR. Various prostanoids may contract vascular smooth muscle by activating TP receptors (Félétou *et al.* 2011). To identify the role of  $\text{TxA}_2$ , aortic segments were incubated with the  $\text{TxA}_2$  synthase inhibitor furegrelate. The fact that furegrelate induced a similar effect on the responses to acetylcholine and phenylephrine in male O-DR aorta suggests that  $\text{TxA}_2$  is the major COX2-derived vasoconstrictor prostanoid released in these vessels. In line with these functional findings, acetylcholine- and phenylephrine-stimulated  $\text{TxA}_2$  concentrations were increased in the aorta from O-DR.

It has been reported that metabolism of COX2 may generate ROS (Cosentino *et al.* 2003) and thus ROS can induce COX2 expression (Martínez-Revelles *et al.* 2013). As pointed out, the oxidative stress and COX2 pathways are involved in the vascular abnormalities in male O-DR, which may suggest a reciprocal involvement of COX2 and ROS. Furthermore, TP receptor activation has also been associated with ROS generation in the whole animal or at the cellular level (Kawada *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2009). Thus, increased  $\text{TxA}_2$  release associated with increased TP receptor activation may also be involved in ROS generation in male O-DR aorta.

Inhibition of COX with indomethacin or NS-398 did not alter the relaxation in response to acetylcholine or the vasoconstriction by activation of  $\alpha$ -adrenoceptors in either the aorta or MRA from female O-DR. Taken together, these results with those previously published by Ramos-Alves *et al.* (2012a, b) indicate that differences of production of COX2-derived vasoconstrictor prostanoids could underlie differences in vascular function between male and female O-DR. Differences in the contribution of COX-derived prostanoids to vascular reactivity between males and females have been reported (Kähönen *et al.* 1998). The exact mechanism underlying these differences is not understood, but may be related to a beneficial effect of oestrogen. This hormone suppresses *cox2* gene expression (Morisset *et al.* 1998; Stacey *et al.* 2016), inhibits oxidative stress (Hernández *et al.* 2000) and increases NO release (Skarsgård *et al.* 1997), altering the relative contributions of NO and prostanoids to endothelium-mediated vascular responses. Moreover, it has been reported that ovariectomy increases COX2 expression (Martorell *et al.* 2009) and release of vasoconstrictor prostanoids (Tada *et al.* 2004), which impair vasodilator responses and increase arterial blood pressure (Hernández *et al.* 2000).

There are some limitations of this study. First, offspring were studied over a range of ages (3–12 months), and



**Figure 9. Increased superoxide anions generation in aorta from O-DR**

Top panels, representative fluorescence microphotographs of aortic sections labelled with the  $\text{O}_2^-$  reactive agent dihydroethidine (DHE; original magnification  $\times 20$ ) in the male O-CR and O-DR. Bottom panel, densitometric analysis of fluorescence intensity of arteries from O-CR and O-DR. The DHE fluorescence signal was evaluated in basal conditions or after incubation with MnTMPyP. Data represent means  $\pm$  SD from five animals in each group. Student's unpaired *t* test,  $*P < 0.05$  versus O-CR.

it is possible that age-related effects in female offspring exist, but were not identified. Second, given that we used STZ to induce maternal hyperglycaemia, our model is one of gestational insulinopenia and hyperglycaemia and not gestational diabetes, a condition of insulin resistance. In addition, it is possible that STZ crossed the placenta and had a toxic effect on the fetal endocrine pancreas. However, we believe this to be unlikely for the following reasons: (i) STZ has a very short (30 min) half-life (Schein & Loftus, 1968); (ii)  $\beta$ -cell development in the rat occurs mainly during the last week of fetal growth (Blondeau & Breant, 2005); and (iii) insulin concentrations were similar in O-DR regardless of exposure to STZ (de Queiroz *et al.* 2015). Finally, the arterial blood pressure was measured just once and, therefore, the influence of the diurnal–nocturnal rhythm on blood pressure was not analysed.

In summary, the results presented here, and previously (Ramos-Alves *et al.* 2012a, b), confirm that hyperglycaemia in pregnant rats induces hypertension in male but not in female offspring. The fact that vascular function, particularly in resistance arteries, is preserved in female O-DR may in part explain the absence of hypertension in animals of this group. In contrast, the peripheral artery dysfunction associated with increased production of COX2-derived vasoconstrictor prostanoids could underlie the increased blood pressure in male O-DR. Accumulating evidence supports the notion that oestrogen prevents hypertension and COX-mediated vascular dysfunction in some circumstances. Therefore, it seems reasonable to assume that this hormone could be responsible for the sex-specific vascular differences observed in male and female offspring from hyperglycaemic dams. However, this possibility requires further detailed investigation.

## References

- Alexander BT (2003). Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* **41**, 457–462.
- Arun KH, Kaul CL & Poduri R (2004). Tempol augments angiotensin II-induced AT2 receptor-mediated relaxation in diabetic rat thoracic aorta. *J Hypertens* **22**, 2143–2152.
- Barker DJ (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* **311**, 171–174.
- Barker DJ (1998). In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* **95**, 115–128.
- Barker DJ (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* **93**, 26–33.
- Blondeau B & Breant B (2005). Effect of nutrition on fetal development: a view on the pancreatic beta-cells. In *Diabetology of Pregnancy*. Front Diabetes, ed. Djelmiss J, Desoye G & Ivanisevic M, vol. 17, pp. 83–93. Karger, Basel.
- Chahwala V & Arora R (2009). Cardiovascular manifestations of insulin resistance. *Am J Ther* **16**, e14–e28.
- Christensen KL & Mulvany MJ (1993). Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats. *J Vasc Res* **30**, 73–79.
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M & Lüscher TF (2003). High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* **107**, 1017–1023.
- Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT & Rossoni LV (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res* **44**, 920–932.
- de Queiroz DB, Sastre E, Caracul L, Callejo M, Xavier FE, Blanco-Rivero J & Balfagón G (2015). Alterations in perivascular innervation function in mesenteric arteries from offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol* **172**, 4699–4713.
- Dodic M, Abouantoun T, O'Connor A, Wintour EM & Moritz KM (2002). Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertension* **40**, 729–734.
- Dong M, Zheng Q, Ford SP, Nathanielsz PW & Ren J (2013). Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *J Mol Cell Cardiol* **55**, 111–116.
- Félétou M, Huang Y & Vanhoutte PM (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* **164**, 894–912.
- Godfrey KM & Barker DJ (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nut* **4**, 611–624.
- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology* and *Experimental Physiology*. *Exp Physiol* **100**, 755–758.
- Hemmings DG, Williams SJ & Davidge ST (2005). Increased myogenic tone in 7-month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H674–H682.
- Hernández I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC & Carbonell LF (2000). 17 $\beta$ -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* **279**, R1599–R1605.
- Holemans K, Gerber R, O'Brien-Coker I, Mallet A, van Bree R, van Assche FA & Poston L (2000). Raised saturated-fat intake worsens vascular function in virgin and pregnant offspring of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Nutr* **84**, 285–296.
- Intapad S, Tull FL, Brown AD, Dasinger JH, Ojeda NB, Fahling JM & Alexander BT (2013). Renal denervation abolishes the age-dependent increase in blood pressure in female intrauterine growth-restricted rats at 12 months of age. *Hypertension* **61**, 828–834.
- Kähönen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X & Pörsti I (1998). Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **275**, H15–H22.
- Katkhuba R, Peterson ES, Roghair RD, Norris AW, Scholz TD & Segar JL (2012). Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. *Pediatr Res* **72**, 352–361.

- Kawada N, Dennehy K, Solis G, Modlinger P, Hamel R, Kawada JT, Aslam S, Moriyama T, Imai E, Welch WJ & Wilcox CS (2004). TP receptors regulate renal hemodynamics during angiotensin II slow pressor response. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F753–F759.
- Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC & Fleming TP (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* **127**, 4195–4202.
- Lawlor DA, Lichtenstein P & Långström N (2011). Association of maternal diabetes mellitus in pregnancy with offspring adiposity into early adulthood: sibling study in a prospective cohort of 280,866 men from 248,293 families. *Circulation* **123**, 258–265.
- Leo C, Hart J & Woodman O (2011). Impairment of both nitric oxide-mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* **162**, 365–377.
- Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM & Salaices M (2013). Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **18**, 51–65.
- Martorell A, Sagredo A, Aras-López R, Balfagón G & Ferrer M (2009). Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. *Cardiovasc Res* **84**, 300–308.
- Morisset S, Party C, Lora M & de Brum-Fernandes AJ (1998). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , glucocorticoids, and 17 $\beta$ -estradiol. *J Rheumatol* **25**, 1146–1153.
- Mulvany MJ & Halpern W (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* **41**, 19–26.
- Nehiri T, Duong Van Huyen JP, Viltard M, Fassot C, Heudes D, Freund N, Deschênes G, Houillier P, Bruneval P & Lelièvre-Pégorier M (2008). Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes* **57**, 2167–2175.
- Nerenberg K, Daskalopoulou SS & Dasgupta K (2014). Gestational diabetes and hypertensive disorders of pregnancy as vascular risk signals: an overview and grading of the evidence. *Can J Cardiol* **30**, 765–773.
- Ojeda NB, Hennington BS, Williamson DT, Hill ML, Betson NE, Sartori-Valinotti JC, Reckelhoff JF, Royals TP & Alexander BT (2012). Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension* **60**, 114–122.
- Ozaki T, Nishina H, Hanson MA & Poston L (2001). Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* **530**, 141–152.
- Porto NP, Jucá DM, Lahlou S, Coelho-de-Souza AN, Duarte GP & Magalhães PJ (2010). Effects of K<sup>+</sup> channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **118**, 360–363.
- Prieto D, Contreras C & Sánchez A (2014). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol* **12**, 412–426.
- Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP & Xavier FE (2012a). Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol* **166**, 2198–2208.
- Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP & Xavier FE (2012b). Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One* **7**, e50593.
- Rocha SO, Gomes GN, Forti ALL, do Carmo Pinho Franco M, Fortes ZB, de Fátima Cavanal M & Gil FZ (2005). Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. *Pediatr Res* **58**, 1274–1279.
- Schein PS & Loftus S (1968). Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* **28**, 1501–1506.
- Simeoni U & Barker DJ (2009). Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med* **14**, 119–124.
- Skarsgård P, van Breemen C & Laher I (1997). Estrogen regulates myogenic tone in pressurized cerebral arteries by enhanced basal release of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **273**, H2248–H2256.
- Stacey W, Bhavé S & Uht RM (2016). Mechanisms by which 17 $\beta$ -estradiol (E2) suppress neuronal *cox-2* gene expression. *PLoS One* **11**, e0161430.
- Tada Y, Ichihara A, Koura Y, Okada H, Kaneshiro Y, Hayashi M & Saruta T (2004). Ovariectomy enhances renal cortical expression and function of cyclooxygenase-2. *Kidney Int* **66**, 1966–1976.
- Tesfamariam B, Jakubowski JA & Cohen RA (1989). Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH<sub>2</sub>-TxA<sub>2</sub>. *Am J Physiol* **257**, 1327–1333.
- Touyz RM (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1263–1273.
- Vasudevan H, Xiang H & McNeill JH (2005). Differential regulation of insulin resistance and hypertension by sex hormones in fructose-fed male rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, 1335–1342.
- Vehaskari VM & Woods LL (2005). Prenatal programming of hypertension: lessons from experimental models. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2545–2556.
- Wichi RB, Souza SB, Casarini DE, Morris M, Barreto-Chaves ML & Irigoyen MC (2005). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, 1129–1133.
- Wilson SJ, Cavanagh CC, Leshner AM, Frey AJ, Russell SE & Smyth EM (2009). Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. *J Lipid Res* **50**, 1047–1056.

- Woods LL, Ingelfinger JR & Rasch R (2005). Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, 1131–1136.
- Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, del Campo L, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M & Balfagón G (2008). Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Br J Pharmacol* **154**, 1225–1235.
- Xiao D, Huang X, Yang S & Zhang L (2013). Estrogen normalizes perinatal nicotine-induced hypertensive responses in adult female rat offspring. *Hypertension* **61**, 1246–1254.
- Yessoufou A & Moutairou K (2011). Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of “metabolic memory”. *Exp Diabetes Res* **2011**, 218598.

## Additional information

### Competing interests

None declared.

### Author contributions

This study was performed in the Laboratory of Vascular Reactivity of the Federal University of Pernambuco, Brazil. Conception or design of the work: G.P.D. and F.E.X. Acquisition,

analysis or interpretation of data for the work: F.G.S., D.B.Q., F.E.R.-A., J.S.-R., O.A.S., H.S.M., G.A.L., M.A.R. and F.E.X. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content: G.P.D. and F.E.X. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

### Funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). F.G.S., O.A.S. and M.A.R. were supported by doctoral degree fellowships from FACEPE. D.B.Q., F.E.R.-A., G.A.L., H.S.M. and J.S.-R. were supported by doctoral degree fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). G.P.D. and F.E.X. are recipients of research fellowships from CNPq. The funder had no role in the study design, data collection or analysis, manuscript preparation or the decision to publish it.

### Acknowledgements

We are grateful to José Antonio de Albuquerque for his technical assistance.

**APÊNDICE B - Female hormones protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in offspring of diabetic rats**

Artigo a ser submetido ao periódico: *Experimental Physiology*

**Female hormones protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in offspring of diabetic rats.**

Francine I. Gomes-de-Sá, Thayane Rebeca A. Santos, Gloria P. Duarte, Fabiano E. Xavier.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

**Corresponding author:** Fabiano E. Xavier, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901, Recife Brazil. E-mail: [fabianoxavier@ufpe.br](mailto:fabianoxavier@ufpe.br), [fabiano.exavier@gmail.com](mailto:fabiano.exavier@gmail.com)

**Keywords:** fetal programming, diabetes, hypertension, vascular dysfunction, estrogen, sexual dimorphism.

## Abstract

We previously reported that female offspring are resistant to prenatal hyperglycemia-induced programming of hypertension and vascular dysfunction. The present study tested the hypothesis that estrogen plays a role in protecting females in fetal programming of hypertension and vascular dysfunction. Pregnant rats were divided into control and diabetic (induced on 7<sup>th</sup> day of gestation) groups. Ovariectomy (OVX) and estrogen (E2, 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , s.c., alternate days) replacement were performed in 8-week-old female offspring of control (O-CR) and diabetic (O-DR) dams. Aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) were used to evaluate the phenylephrine- and noradrenaline-induced contraction, respectively, and relaxation to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP). Mean arterial pressure was similar in all groups (O-CR-Sham:  $99.6 \pm 1.95$ ; O-CR-OVX:  $103 \pm 2.47$ ; O-DR-Sham:  $99.6 \pm 3.71$ ; O-DR-OVX:  $100 \pm 2.14$  and O-DR-OVX-E2:  $95.7 \pm 1.46$  mmHg,  $P > 0.05$ ). Ovariectomy in O-CR reduced ACh-induced relaxation and increased contractile responses in both aorta and MRA. These changes were abolished by preincubation of arteries with tempol or apocynin. E2 replacement prevented the vascular changes induced by ovariectomized in arteries from O-DR group. In O-DR-OVX-E2 apocynin or tempol failed to produce alterations on relaxation to acetylcholine and contraction to noradrenaline or phenylephrine. Relaxation to SNP was similar in all groups. The results indicate that estrogen is not directly responsible for the sex dimorphism in fetal programming of hypertension in female offspring of diabetic rats. Results from this study also indicate that estrogen may function as an antioxidant, resulting in protection of females from development endothelial dysfunction in adulthood.

## 1. Introduction

The fetal origin hypothesis proposes that adverse insults during intrauterine life result in developmental adaptations which can lead to long-term health risk and illness, such as metabolic and cardiovascular diseases (Barker *et al.*, 1995). Several studies with animal models have provided evidences of fetal programming events, showing that changes in maternal nutrition (protein restriction, high-sodium diet, etc) (Woods *et al.*, 2005; Vehaskari & Woods, 2005), uteroplacental insufficiency (Ojeda *et al.*, 2007), and exposure to maternal glucocorticoids (Dodic *et al.*, 2002) or hyperglycemia (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b) can have long-term effects on the offspring that are relevant to human cardiovascular diseases.

Gender influences on incidence and severity of cardiovascular diseases have been reported in various fetal programming models. Previous studies showed higher hypertension incidence in male offspring whose mothers had been treated with nutrient restriction (Kwong *et al.*, 2000), high-saturated fat diet (Langley-Evans, 1996), utero-placental insufficiency (Alexander, 2003), moderate sodium intake (Woods & Rasch, 2011) or exposure to glucocorticoids (Dodic *et al.*, 2002) that is not present in female offspring. Moreover, some prenatal manipulations have resulted in the vascular response to fetal insult according to gender differences (Ozaki *et al.*, 2001). Other studies have revealed that ovariectomy can increase the blood pressure in growth-restricted female offspring, which was reversed by estrogen replacement (Ojeda *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2013), indicating a role for sex hormones on modulating cardiovascular responses to an adverse fetal environment.

In our previous studies by maternal hyperglycemia fetal programming animal model, hypertension development was only observed in male offspring (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b; Gomes-de-Sá *et al.*, 2015), as also showed by Katkhuda *et al.*, (2012). Among the male offspring animals, the hyperglycemia-programmed hypertension was age-dependent (Nehiri *et al.*, 2005; Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b; Gomes-de-Sá *et al.*, 2015) and has been partially attributed to baroreflex dysfunction (Wichi *et al.*, 2015) and nephron deficiency (Chen *et al.*, 2010). In addition, we have reported that functional changes in vasculature may also contribute to increased blood pressure in male offspring of diabetic dams. These vascular abnormalities are characterized by impaired endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and increased contractile responses to vasoconstrictor agents to noradrenaline, which are associated to cyclooxygenase (COX)-2 up-regulation and enhanced reactive oxygen species generation (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b; Gomes-de-Sá *et al.*, 2015). Interestingly, female offspring of diabetic dams have preserved the relaxation to acetylcholine and contractile responses to alpha-adrenergic activation in both conductance and resistance arteries (Gomes-de-Sá *et al.*, 2015). Therefore, these results indicate that male offspring are more sensitive to exposure of hyperglycemia during development and that female offspring are less sensitive or protected against development of vascular dysfunction in response to fetal insult.

Based on the presented evidences, we hypothesize that estrogen may protect against increases in blood pressure and vascular dysfunction in hyperglycemia-programmed female offspring. Thus, our aim was to study the effect of ovariectomy and estrogen replacement on vascular reactivity of aorta

and mesenteric resistance arteries in adult hyperglycemia-programmed female offspring.

## Methods

### *Animals housing and experimental procedures*

Female offspring rats from diabetic (O-DR) and control rats (O-CR) were divided into four groups: control (SHAM) and ovariectomized (OVX) rats, treated or untreated with  $17\beta$ -estradiol. Bilateral ovariectomy was induced at 4 weeks of age, and 3 months later the animals were sacrificed. In the  $17\beta$ -estradiol-treated groups, this hormone was administered from the 2<sup>nd</sup> month of age. All animals were housed in the Animal Facility of the *Departamento de Fisiologia e Farmacologia* of the *Universidade Federal de Pernambuco*. Diabetes in pregnancies Wistar rats (250–300 g) was induced by a single injection of streptozotocin (50 mg/kg body weight; i.p.) on the 7th day of gestation, as previously reported (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b). Only pregnant females whose plasma glucose ranged between 250 and 500 mg/dL were included in the study. After birth, each litter was reduced to six pups. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the Animal Care and Use Committee of the *Universidade Federal de Pernambuco* (approval reference number: 23076.040928/2011-18).

### *Arterial blood pressure measurement*

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine and acetopromazin mixture (64.9; 3.2 and 0.78 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectively, *i.p.*). The right carotid artery was cannulated with a polyethylene catheter (PE-50) that was exteriorized in the mid scapular region. Adequacy of anaesthesia was assessed by monitoring

withdrawal reflexes. After 24 hours, arterial pressure was measured in conscious, freely moving rats. The arterial cannula was connected to a transducer and pressure signals were recorded for a 60-min period using an interface and software for computer data acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).

#### *Vascular reactivity study*

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine and acetopromazin mixture (64.9; 3.2 and 0.78 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectively, *i.p.*), sacrificed by exsanguination and the thoracic aorta and the mesenteric arcade was carefully removed and placed in cold (4°C) Krebs Henseleit solution (KHS; in mM: 115 NaCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 4.6 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 glucose, and 0.03 EDTA). The aorta was carefully dissected out, cleaned of connective tissue and divided into segments of 3 mm in length. Each arterial segment was mounted between two parallel wires in tissue baths at 37°C containing KHS gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> to maintain the pH at 7.4. The arterial segments were stretched to an optimal resting tension of 1.0 g. Isometric tension was recorded using an isometric force displacement transducer (Letica TRI 201, Panlab, S.L., Barcelona, Spain) connected to an acquisition system (ML870/P ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).

With the use of a dissecting microscope, third-order small mesenteric arteries were isolated, divided into segments of approximately 2 mm in length and mounted in a small vessel dual chamber myograph (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) for measurement of isometric tension according to the method described by Mulvany & Halpern (1977).

### *Experimental protocols*

After a 45 min equilibration period, aorta and mesenteric resistance arteries were exposed to 75 and 120 mmol/L KCl, respectively, to check their functional integrity. Then, concentration–response curves to acetylcholine (0.1 nmol/L–30  $\mu$ mol/L) and sodium nitroprusside (0.1 nmol/L–30  $\mu$ mol/L) were performed in mesenteric resistance arteries and aorta previously contracted with noradrenaline or phenylephrine, respectively, at a concentration that produced approximately 50–70% of the contraction induced by KCl in each case. After 60 min, concentration–response curves to phenylephrine (1 nmol/L–10  $\mu$ mol/L) were performed in thoracic aorta. In resistance arteries, noradrenaline (10 nmol/L–30  $\mu$ mol/L) was used to study the vasoconstriction induced by  $\alpha$ -adrenoceptor activation because noradrenaline produced responses that were more stable than those produced by phenylephrine. Additionally, the effects of the nonselective NO synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100  $\mu$ mol/L), the superoxide dismutase mimetic Tempol (10  $\mu$ mol/L) or apocynin (NADPH oxidase inhibitor, 100  $\mu$ mol/L) on concentration–response curves for acetylcholine and phenylephrine or noradrenaline were analyzed.

### *Drugs*

Drugs used were noradrenaline hydrochloride, sodium nitroprusside, acetylcholine chloride, N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), phenylephrine hydrochloride, apocynin and tempol (Sigma, St. Louis, MO, USA). Stock solutions of acetylcholine chloride, phenylephrine, sodium nitroprusside, apocynin and tempol were made in distilled water; noradrenaline

was dissolved in a NaCl (0.9%)–ascorbic acid (0.01% w v<sup>-1</sup>) solution. These solutions were kept at -20°C and appropriate dilutions were made on the day of the experiment.

### *Data Management and Statistical Analysis*

Relaxation response to acetylcholine and sodium nitroprusside was expressed as the percentage of relaxation of the maximum contractile response induced by phenylephrine or noradrenaline. Contractile responses to phenylephrine and noradrenaline were expressed as a percentage of the maximum response produced by KCl.

All values are expressed as means SEM of the number of animals used in each experiment. Results were analyzed using two-way ANOVA for comparison between groups. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's *post hoc* test was used to compare individual means. A difference with  $P < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### *Body and Uterus Weight*

The body weights (BW) of ovariectomized rats were significantly greater than those of Sham rats (O-CR-Sham: 226±11.4 vs. O-CR-OVX: 304±11.0 g,  $P < 0.05$ ; O-DR-Sham: 186±4.09 vs. O-DR-OVX: 224±12.7 g,  $P < 0.05$ ). The deficiency of estrogen in OVX group decreased uterine weight compared to Sham controls (Uterus/BW, O-CR-Sham: 3.03±0.52 vs. O-CR-OVX: 0.24±0.04 mg/g,  $P < 0.05$ ; O-DR-Sham: 2.97±0.62 vs. O-DR-OVX: 0.27±0.06 mg/g,  $P < 0.05$ ).

### *Blood pressure*

Mean arterial pressure was similar in all experimental groups (O-CR-Sham:  $99.6 \pm 1.95$ ; O-CR-OVX:  $103 \pm 2.47$ ; O-DR-Sham:  $99.6 \pm 3.71$ ; O-DR-OVX:  $100 \pm 2.14$  and O-DR-OVX-E2:  $95.7 \pm 1.46$  mmHg, ANOVA:  $P > 0.05$ ).

### *Vascular reactivity*

KCl (120 mM in mesenteric resistance arteries and 75 mM in aorta) evoked contractions in vessels from O-DR-Sham that were similar to those obtained in vessels from O-CR-Sham for both the mesenteric resistance arteries (O-CR-Sham:  $6.05 \pm 0.53$  vs. O-DR-Sham:  $6.33 \pm 0.17$  mN/mm,  $P > 0.05$ ) and aorta (O-CR-Sham:  $10.1 \pm 0.80$  vs. O-DR-Sham:  $9.98 \pm 0.83$  mN,  $P > 0.05$ ) arteries. Ovariectomy or replacement with  $17\beta$ -estradiol did not change KCl response (results not shown) in either type of arteries from O-DR and O-CR.

In mesenteric resistance arteries and aorta precontracted with noradrenaline or phenylephrine, respectively, acetylcholine or sodium nitroprusside induced a concentration-dependent relaxation that was similar in arteries from O-DR-Sham or O-DR-Sham, as previously reported (Gomes-de Sá *et al.*, 2015) (Figure 1A and B). Ovariectomy did not change acetylcholine-induced relaxation in arteries from O-CR, but impaired it in both mesenteric resistance arteries and aorta from O-DR (Figure 1A and B). Likewise, contractile response induced by  $\alpha$ -1-adrenergic receptor activation (noradrenaline or phenylephrine) was not different in arteries from O-DR than O-CR (Figure 1C and D). In mesenteric resistance arteries, ovariectomy increased this response only in O-DR group (Figure 1C). In aorta, ovariectomy

increased this response in both O-DR and O-CR aorta, but this increment was greater in the O-DR group (Figure 1D).

Inhibition of NO synthesis (L-NAME) increased similarly the vasoconstriction to phenylephrine in aorta from both O-DR-Sham and O-DR-Sham (compare Figure 2A with 2B). This increase produced by L-NAME was lesser in aorta from O-CR-OVX (Figure 2A) and it was abolished in aorta from O-DR-OVX. In mesenteric resistance arteries, L-NAME increased the contractile response to noradrenaline similarly in all groups, except in O-DR-OVX (Figure 2C and D), where L-NAME failed to increase noradrenaline-induced vasoconstriction (Figure 2D).

Incubation with the membrane permeable superoxide mimetic tempol or the NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin increased the acetylcholine-induced response in mesenteric resistance arteries and aortas from O-DR-OVX (Figure 3A and B), but not in O-CR-OVX (results not shown). In arteries from O-CR-OVX, pre-incubation with the tempol or apocynin did not modify the vasoconstrictor responses to noradrenaline or phenylephrine (results not shown), but decreased it in arteries from O-DR-OVX group (Figure 3C and D).

Replacement of  $17\beta$ -estradiol in the O-DR-OVX group restored the altered acetylcholine and phenylephrine/noradrenaline responses in both aorta and mesenteric resistance arteries (Figure 4). In this group, the effect of L-NAME on phenylephrine- and noradrenaline-induced contraction was restored by estrogen replacement (compare Figure 6 with Figure 2B and 2D). In addition, in  $17\beta$ -estradiol-treated O-DR-OVX group neither tempol nor apocynin changed the acetylcholine-induced relaxation (Figure 5) or the

phenylephrine/noradrenaline-induced vasoconstriction (Figure 6).  $17\beta$ -estradiol replacement have no effect on arteries from O-CR-OVX group (results not shown).

## Discussion

Our previous studies have demonstrated that exposure to maternal hyperglycemia causes a gender-dependent increase in blood pressure and vascular dysfunction in adult male but not in female offspring (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b; Gomes-de-Sá *et al.*, 2015). The present study provides new evidence that estrogen plays a key role in protecting females against prenatal hyperglycemia-programmed vascular dysfunction in adult offspring. The major findings of the present study show that, a). ovariectomy uncovered hyperglycemia-induced programming of increase vasoconstriction and impaired endothelium-dependent relaxation in offspring, b) estrogen replacement reversed the ovariectomy-induced vascular changes, c) ovariectomy increased the participation of NAD(P)H oxidase-derived ROS on contractile responses and endothelium-dependent relaxation, which was reversed by estrogen replacement, and d) inhibition of ROS production by apocynin and tempol abolished the vascular abnormalities resulted from prenatal exposure to hyperglycemia in ovariectomized females.

Gender-related differences are observed in the blood pressure response to several fetal programming models (Dodic *et al.*, 2005; Ojeda *et al.*, 2007; Woods *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2013). Most of the studies indicate that male offspring develop hypertension, whereas female offspring seem to be protected (Ojeda *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2013). These differences have been attributed to the protective effect of estrogen, as suggested by Ojeda *et al.* (2007). These authors demonstrated that ovariectomy induces hypertension in female intrauterine growth-restricted offspring, which was reversed by estrogen replacement (Ojeda *et al.*, 2007). Results of the current study revealed that

ovariectomy or estrogen replacement did not alter the blood pressure in O-DR and O-CR. These findings suggest that, unlike other fetal programming models, estrogen is not directly responsible for the protection against the hyperglycemia-programmed hypertension in female offspring. However, another fact should be considered: the age of animals. In male hyperglycemia-programmed offspring, we (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b) and others (Nehiri *et al.*, 2008) have reported that the increase in blood pressure is age-dependent. In these rats, hypertension was evident only from 6 months old (Nehiri *et al.*, 2008; Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b). In the current work, we used 4-month-old female offspring. Therefore, it is possible that changes in blood pressure due to ovariectomy may be observed in older offspring. This hypothesis needs to be considered in future studies. On the other hand, although it is widely recognized that differences in sex hormones contribute to sexual dimorphism in several fetal programming models, recent efforts have raised many more questions and much remains unclear about the sex role in programmed hypertension (Gilbert & Nijland, 2008).

Endothelial dysfunction is considered a premature sign of increased cardiovascular risk and vessel damage and is present in the postmenopausal period (Mendelsohn & Karas, 1999). We have demonstrated that female offspring are also protected from hyperglycemia-programmed endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries (Gomes-de-Sá *et al.*, 2015). Thus, experiments were designed to test the hypothesis that estrogen would be involved on this vascular protection in female O-DR. As previously reported (Martorell *et al.*, 2009, Xiao *et al.*, 2013), ovariectomy did not alter acetylcholine-induced relaxation in both aorta and mesenteric resistance arteries from female

O-CR. On the other hand, ovariectomized O-DR showed impaired relaxation to acetylcholine in both aorta and mesenteric resistance arteries. Ovariectomy also enhanced the contractile response of the O-CR and O-DR aorta to the alpha-1-adrenoceptor agonist phenylephrine; however, this effect was greater in arteries from O-DR. In mesenteric resistance arteries, an increase in noradrenaline-induced vasoconstriction was observed only in ovariectomized O-DR. Estrogen replacement abolished all vascular changes induced by ovariectomy in female O-DR, indicating that this hormone does provide a protective status in the vasculature of female O-DR.

The mechanisms involved in the vascular changes in arteries from ovariectomized O-DR were investigated in the present work. First, we analyzed the mechanism in the enhanced contractility to phenylephrine and noradrenaline in arteries from ovariectomized O-DR. We found reduced endothelium-derived NO, as evidenced by the minor effect of L-NAME enhancing the vasoconstriction to these alpha-adrenergic agonists in arteries from ovariectomized O-DR. Thus, the enhanced contractile response to phenylephrine and noradrenaline observed in ovariectomized O-DR may be related to an impairment of the endothelium-derived NO.

Under certain circumstances such as ovarian hormone loss in women, degradation of NO is increased by enhanced vascular reactive oxygen species (ROS), which can lead to impaired endothelium-dependent relaxation and increased vasoconstrictor response (Mendelsohn & Karas, 1999). In this sense, Zhang *et al.* (2007) have demonstrated that ovariectomy increased superoxide production in aorta from Dahl salt-sensitive rats. In the present study, incubation with the superoxide dismutase mimetic tempol increased relaxation to

acetylcholine and decreased phenylephrine- and noradrenaline-induced contraction in aorta and resistance arteries, respectively, from ovariectomized O-DR, indicating a role for ROS in the vascular changes observed in these vessels. Tempol did not affect relaxation or contraction responses of Sham or ovariectomized O-CR vessels, implying that ROS has undetectable effect on vascular reactivity in these groups. Previous studies have revealed that ovariectomy increases NAD(P)H oxidase expression and/ activity in several tissues (Ribeiro *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014;). At the vascular level it has been associated with increased ROS generation and contractions and impaired acetylcholine-induced relaxation in diabetic (Ceylan-Isik *et al.*, 2009) and spontaneously hypertensive rats (Dantas *et al.*, 1999; Ceravolo *et al.*, 2013). Apocynin is commonly used as an inhibitor of NADPH oxidase. The present finding that apocynin was able to normalize both endothelium-dependent relaxation and contraction of arteries from ovariectomized O-DR suggests that NADPH oxidase-derived ROS plays a role in endothelial dysfunction induced by ovariectomy in these rats.

Estrogen replacement in ovariectomized O-DR increased relaxation to acetylcholine and decreased phenylephrine- and noradrenaline-induced contractions, which were not further altered by preincubation with apocynin or tempol. In addition, in arteries from ovariectomized O-DR the effect of L-NAME on phenylephrine- and noradrenaline-induced vasoconstriction was restored by estrogen replacement. These findings suggest that estrogen regulates NO-mediated vascular responses through ROS signaling pathway. Indeed, several studies have reported that estrogen can act as an antioxidant to regulate cardiovascular function (Mendelsohn & Karas, 1999). Ovariectomy has been

associated to increased ROS production in several tissues (Camporez *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012) and decreased NO bioavailability. In addition, previous studies have demonstrated that estrogen also inhibits NADPH oxidase activity via the estrogen receptor (Zhang *et al.*, 2009). Taken all together, it is reasonable to hypothesize that estrogen, serving as an antioxidant and/ or by inhibiting NAD(P)H oxidase inhibit ROS generation and contribute to the sex differences in the effects of prenatal hyperglycemia exposure on vascular function in adult offspring. The fact that offspring did not become hypertensive after ovariectomy, despite vascular changes, may be related to age. As we have reported previously, the hyperglycemia-programmed vascular changes in male offspring are age-dependent and precede the increase in blood pressure (Ramos-Alves *et al.*, 2012a,b). However, other characteristics related to gender must be taken into consideration.

In summary, our results demonstrate for the first time that estrogen plays a key role in the sex differences of the hyperglycemia-programmed endothelial dysfunction in adult offspring. Results from this study also indicate that estrogen may function as an antioxidant, resulting in protection of females from development endothelial dysfunction in adulthood. Future studies are needed to clarify why ovariectomized offspring did not develop hypertension, as well as the signaling interactions with sex hormones secondary to the development of endothelial dysfunction.

**Acknowledgements**

This work was support by grants from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Francine G. de Sá was supported by a doctoral degree fellowship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Gloria P. Duarte and Fabiano E. Xavier are recipients of research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are grateful to José Antonio de Albuquerque for his technical assistance.

**Conflict of interest.**

None

## References

Alexander BT (2003). Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* **41**, 457–462.

Barker DJ (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* **311**,171-174.

Camporez JP, Akamine EH, Davel AP, Franci CR, Rossoni LV, Carvalho CR (2011). Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol* **589**, 2585-2596.

Campos C, Sartorio CL, Casali KR, Fernandes RO, Llesuy S, da Rosa Araujo AS, Belló-Klein A, Rigatto KV (2014). Low-dose estrogen is as effective as high-dose treatment in rats with postmenopausal hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **63**, 144-151.

Ceravolo GS1, Filgueira FP, Costa TJ, Lobato NS, Chignalia AZ, Araujo PX, Tostes RC, Dantas AP, Fortes ZB, Carvalho MH (2013). Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Steroids* **78**, 341-346.

Ceylan-Isik AF1, Erdogan-Tulmac OB, Ari N, Ozansoy G, Ren J. Effect of 17beta-oestradiol replacement on vascular responsiveness in ovariectomized diabetic rats (2009). *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, e65-71.

Chen YW, Chenier I, Tran S, Scotcher M, Chang SY & Zhang SL (2010). Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. *Pediatr Nephrol* **25**, 1319-1329.

Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH (1999). Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **34**, 914-919.

Dodic M, Abouantoun T, O'Connor A, Wintour EM, Moritz KM (2002). Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertension* **40**, 729–734.

Gilbert JS, Nijland MJ (2008). Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, 1941-1952.

Katkhuda R, Peterson ES, Roghair RD, Norris AW, Scholz TD, Segar JL (2012). Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. *Pediatr Res* **72**, 352-361.

Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* **127**, 4195–4202.

Martorell A, Sagredo A, Aras-López R, Balfagón G, Ferrer M (2009). Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. *Cardiovasc Res* **84**, 300-308

Mendelsohn ME, Karas RH (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **340**, 1801–1811.

Mulvany MJ & Halpern W (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* **41**, 19-26.

Nehiri T, Duong Van Huyen JP, Viltard M, Fassot C, Heudes D, Freund N, Deschênes G, Houillier P, Bruneval P & Lelièvre-Pégorier M (2008). Exposure

to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes* **57**, 2167-2175

Ojeda NB, Hennington BS, Williamson DT, Hill ML, Betson NE, Sartori-Valinotti JC, Reckelhoff JF, Royals TP, Alexander BT (2012). Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension* **60**, 114-122.

Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L (2001). Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* **530**, 141–152.

Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE (2012a). Effect of age and cox-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol* **166**, 2198-2108.

Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE (2012b). Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One* **7**, e50593.

Ribeiro RF Jr, Pavan BM, Potratz FF, Fiorim J, Simoes MR, Dias FM, Lima FL, Fernandes AA, Vassallo DV, Stefanon I (2012). Myocardial contractile

dysfunction induced by ovariectomy requires AT1 receptor activation in female rats. *Cell Physiol Biochem* **30**, 1-12.

Ribeiro RF Jr, Potratz FF, Pavan BM, Forechi L, Lima FL, Fiorim J, Fernandes AA, Vassallo DV, Stefanon I (2013). Carvedilol prevents ovariectomy-induced myocardial contractile dysfunction in female rat. *PLoS One* **8**, e53226.

Wichi RB, Souza SB, Casarini DE, Morris M, Barreto-Chaves ML & Irigoyen MC (2005). Fetal Physiological Programming Increased blood pressure in the offspring of diabetic

mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, 1129-1133.

Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L (2013). Estrogen normalizes perinatal nicotine-induced hypertensive responses in adult female rat offspring. *Hypertension* **61**, 1246-54

Woods LL, Ingelfinger JR, Rasch R (2005). Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, 1131–1136.

Vehaskari VM, Woods LL (2005). Prenatal programming of hypertension: Lessons from experimental models. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2545–2556.

Zhang L, Fujii S, Kosaka H (2007). Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* **25**, 407-414.

Zhang QG, Raz L, Wang R, Han D, De Sevilla L, Yang F, Vadlamudi RK, Brann DW (2009). Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J Neurosci* **29**, 13823-13836

## Legends for figures

**Figure 1.** Concentration-responses curves to acetylcholine (A,B), noradrenaline (C), and phenylephrine (D) in mesenteric resistance arteries (MRA) and aorta from sham-operated (Sham) and ovariectomized (OVX) offspring of control (O-CR) and diabetic (O-DR) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, N=6-7 rats. Results were analyzed by two-way ANOVA.

**Figure 2.** Effects of the inhibition of nitric oxide synthesis (L-NAME, 100 $\mu$ mol/L) on phenylephrine- (A, B) and noradrenaline-induced contraction in aortic rings and mesenteric resistance arteries (MRA) from sham-operated (Sham) and ovariectomized (OVX) offspring of control (O-CR) and diabetic (O-DR) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, N=6-7 rats. Results were analyzed by two-way ANOVA.

**Figure 3.** Effects of preincubation with tempol or apocynin on acetylcholine (A,B), noradrenaline (C) and phenylephrine (D) responses in aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from sham-operated (Sham) and ovariectomized (OVX) offspring of control (O-CR) and diabetic (O-DR) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, N=6-7 rats. Results were analyzed by two-way ANOVA.

**Figure 4.** Concentration-responses curves to acetylcholine (A,B), noradrenaline (C), and phenylephrine (D) in mesenteric resistance arteries (MRA) and aorta from estrogen (E2)-treated and untreated ovariectomized (OVX) offspring of diabetic dams (O-DR). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, N=6-8 rats. Results were analyzed by two-way ANOVA.

**Figure 6.** Effects of preincubation with tempol or apocynin on acetylcholine-induced relaxation in aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from estrogen (E2)-treated ovariectomized (OVX) offspring of diabetic (O-DR) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, N=6-7 rats. Results were analyzed by two-way ANOVA.

**Figure 6.** Effects of preincubation with L-NAME, tempol or apocynin on noradrenaline- (A) and phenylephrine (B)-induced contraction in aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from estrogen (E2)-treated ovariectomized (OVX) offspring of diabetic (O-DR) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, N=6-7 rats. Results were analyzed by two-way ANOVA.

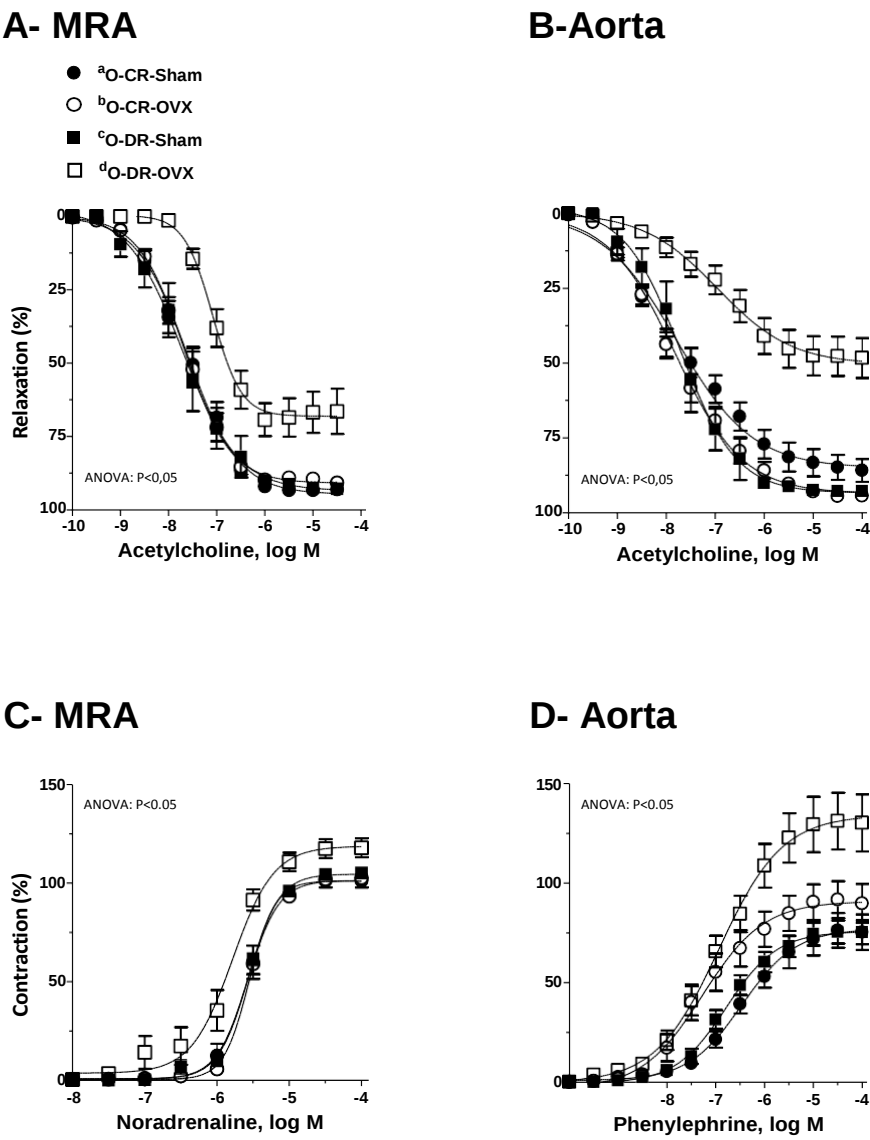
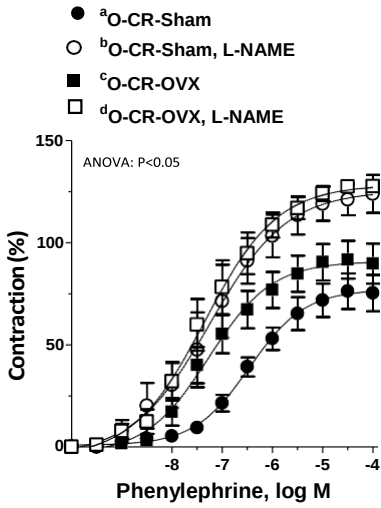
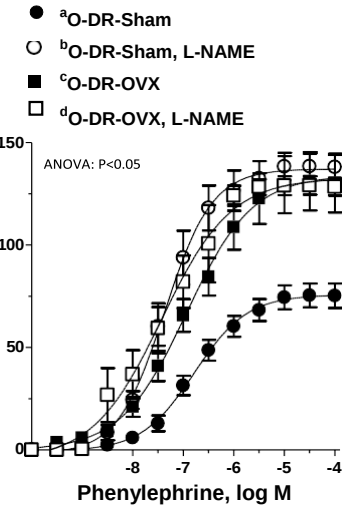


Figure 1

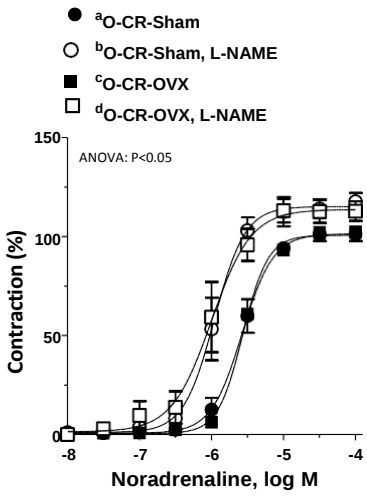
A- Aorta



B- Aorta



C- MRA



D- MRA

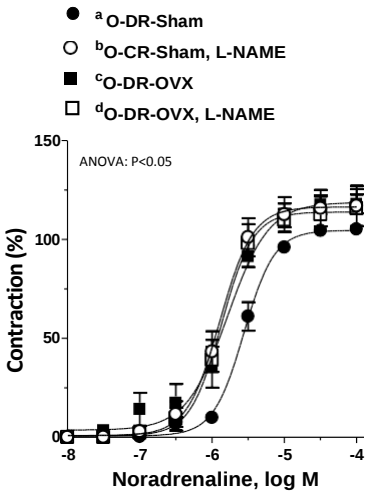
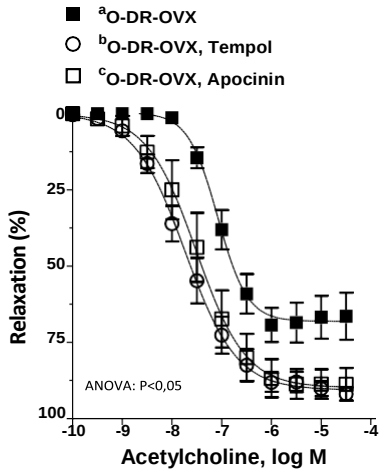
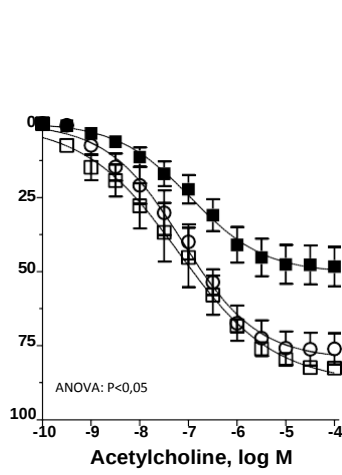


Figure 2

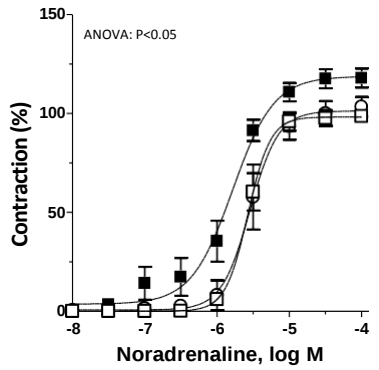
A- MRA



B- Aorta



C- MRA



D- Aorta

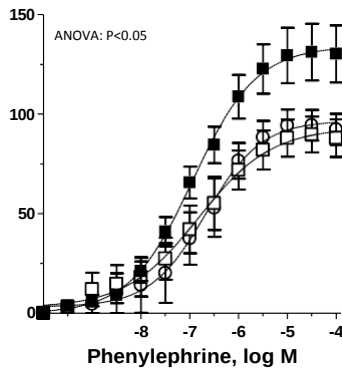


Figure 3

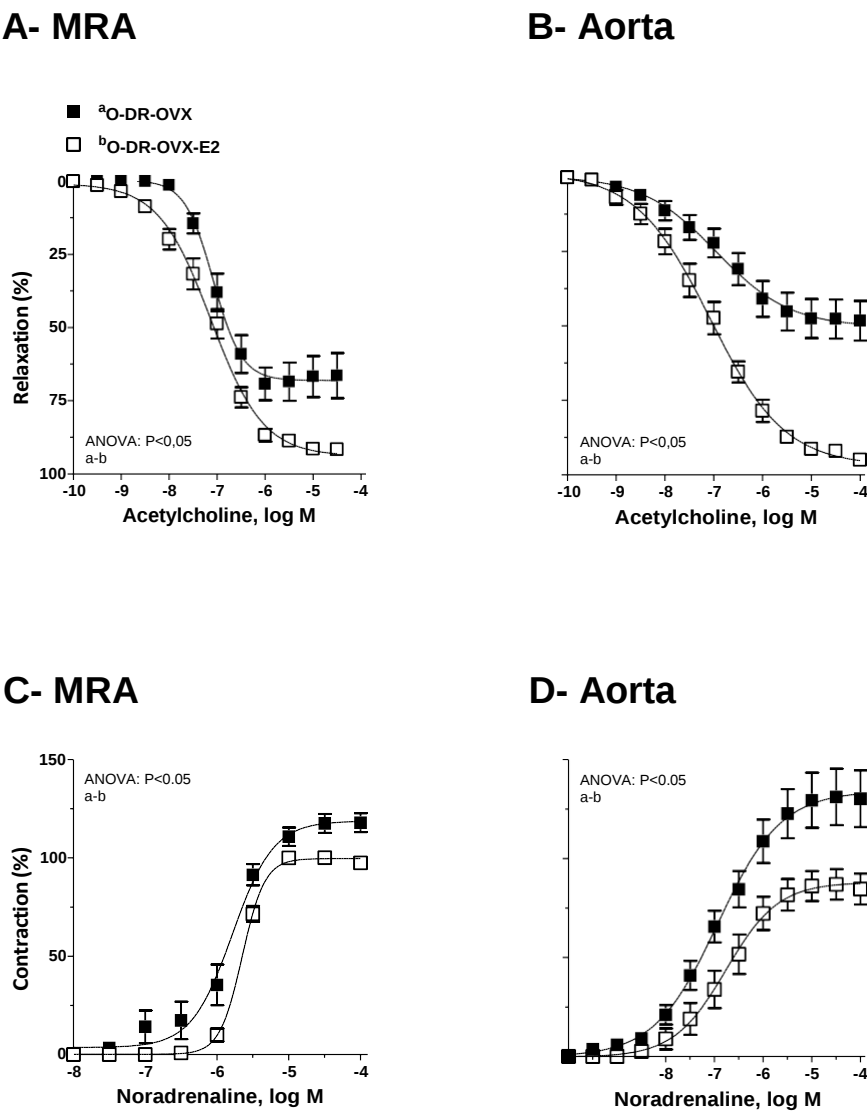
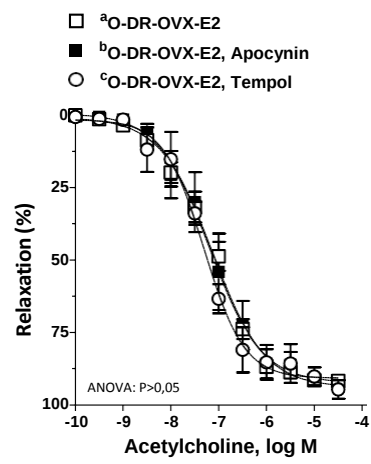
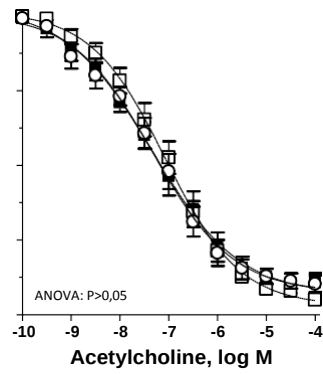


Figure 4

**A- MRA****B- Aorta****Figure 5**

A- MRA

B- Aorta

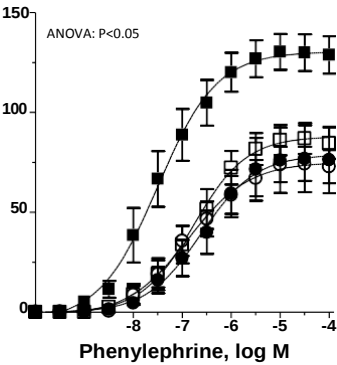
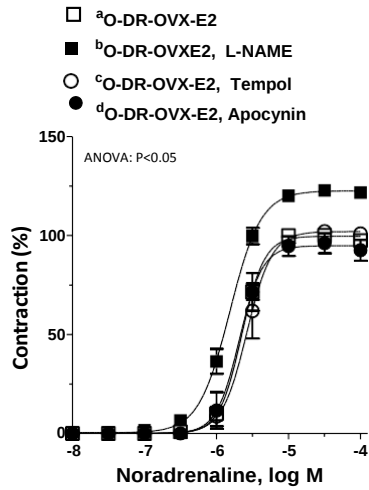


Figure 5

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a exposição ao diabetes materno durante a gestação em ratos resulta em disfunção endotelial e hipertensão arterial tempo-dependentes na prole adulta. Estas alterações são dependentes do sexo, onde o estrogênio, embora não pareça estar envolvido na proteção contra o desenvolvimento de hipertensão na prole fêmea, protege esta das alterações vasculares decorrentes do aumento do estresse oxidativo e da via da COX-2.