

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

GEÓRGIA MARIA RICARDO FÉLIX DOS SANTOS

**DIABETES GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA:
CONTRIBUIÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ENZIMA NADPH OXIDASE
NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CARDIOVASCULARES NA PROLE**

Recife - PE
2018

GEÓRGIA MARIA RICARDO FÉLIX DOS SANTOS

**DIABETES GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA:
CONTRIBUIÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ENZIMA NADPH OXIDASE
NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CARDIOVASCULARES NA PROLE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cristina de Oliveira Silva

Recife - PE
2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Geórgia Maria Ricardo Félix dos

Diabetes gestacional induzido por estreptozotocina : contribuição do estresse oxidativo e da enzima NADPH oxidase no desenvolvimento de lesões cardiovasculares na Prole / Geórgia Maria Ricardo Félix dos Santos. – 2018.

172 f. : il.

Orientadora: Glória Isolina Boente Pinto Duarte.

Coorientadora: Cristina de Oliveira Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Diabetes 2. Glândulas endócrinas - Doenças I. Duarte, Glória Isolina Boente Pinto (orientadora) II. Silva, Cristina de Oliveira (coorientadora) III. Título.

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 043

GEÓRGIA MARIA RICARDO FÉLIX DOS SANTOS

**DIABETES GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA:
CONTRIBUIÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ENZIMA NADPH OXIDASE
NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CARDIOVASCULARES NA PROLE**

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

Aprovada em: 13/ 07/ 2017

Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Silva

Profa. Dra. Valéria Nunes de Souza

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira

Prof. Dr. Mohamed Saad Lahlou

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes

Dedico esta tese a todos que amo e que me ensinaram a lutar e a valorizar as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Professoras Cristina de Oliveira e Glória Isolina Boente Pinto Duarte, pela oportunidade de abrir os meus horizontes. Serei sempre grata a ambas pela transmissão de experiências, pela criação e solidificação de saberes e pela contribuição para o meu desenvolvimento pessoal.

Aos professores Dayane Aparecida Gomes, Eduardo Carvalho Lira, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, Ivson Bezerra da Silva e Maria Luiza Barreto de Chaves pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia pela colaboração na evolução do meu conhecimento acadêmico.

A todos que fazem/ fizeram parte do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LFFCV) e do Laboratório de Reatividade Vascular (LRV): Diego de Queiroz, Diego Rafael, Fernanda Elizabethe, Francine Iane, Geórgia Leal, Hicla Stefany, José Jairo, Juliana Dantas, Juliana Rocha, Leonardo Gomes, Luciana Veloso, Marcelo Rocha, Odair Alves, Thaise Figueiredo e Thayane Rebeca.

A todos do laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional (LBCAF) da Universidade de São Paulo, em especial Ana Paula Takano, Camila Rodrigues, Caroline Antunes e Marina Fevereiro.

Ao técnico José Antônio e a veterinária Cláudia Oliveira pelo cuidado e atenção com os animais.

A técnica Dijanah Cota pela disponibilidade e colaboração no preparo e padronização das soluções.

A secretaria do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia: Djalma Gomes e Laysa Souza, pelo auxílio nas questões administrativas.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela disposição em ajudar.

Aos colegas do departamento e de outros laboratórios, em especial Dionísio Henrique, Humberto Barbosa, Riciele Lopes e Thiago David.

A banca examinadora, pelas considerações que guiaram a confecção final deste trabalho.

Ao apoio financeiro: CNPq, FACEPE, CAPES.

A minha família pela torcida e confiança.

Ao meu noivo Bernardo Belmonte pelo carinho, apoio, paciência e incentivo irrestrito e fundamental em todos os momentos.

A Deus pela força superior.

A todos, que não foram citados, mas que contribuíram igualmente direta ou indiretamente para que esta tese se tornasse uma realidade.

Os meus sinceros agradecimentos...

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

RESUMO

O Diabetes gestacional pode induzir alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, as quais podem resultar em malformações congênitas e no aparecimento de doenças cardiovasculares na vida adulta. A formação excessiva dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), a ligação com seu receptor (RAGE), a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), bem como o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), derivadas principalmente das várias isoformas da NADPH-oxidases (Nox), são os mecanismos que ligam a hiperglicemia crônica e as alterações cardiovasculares observadas em animais e pacientes diabéticos. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa demonstrou uma elevação dos níveis plasmáticos de AGEs na prole de mães diabéticas aos 4 meses de idade e um aumento da expressão proteica do RAGE e do estresse oxidativo cardíaco aos 6 meses de idade. No presente estudo, foi avaliada a contribuição tempo dependente do estresse oxidativo e do RAGE no desenvolvimento das complicações cardiovasculares, em aortas aos 3, 6 e 12 meses e em corações aos 12 e 18 meses de idade de animais expostos ao diabetes gestacional induzido por estreptozotocina (STZ). Para isto, o diabetes foi induzido no sétimo dia de gestação com dose única de STZ (50mg/kg, i. p.) dissolvida em tampão citrato. Fêmeas controles receberam apenas veículo. A prole foi dividida em dois grupos de acordo com o tratamento materno: controle não diabético (ND) e diabetes gestacional (DG). Os protocolos experimentais para avaliação dos níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e homeostase glicêmica foram realizados. A concentração de glicogênio hepático e muscular foi determinada pelo método da antrona. Os níveis de estresse oxidativo foram verificados através das atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD), bem como dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), nitritos, glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG). A expressão proteica do RAGE e da Nox4 foram analisadas através de *Western Blot*. A quantificação do volume de colágeno e densidade capilar foi avaliada pela técnica histológica. A exposição a alterações do meio intrauterino, provocada pela hiperglicemia, induziu baixo peso ao nascimento que se manteve até a idade adulta. A prole DG apresentou um aumento significativo dos níveis de triglicerídeos, intolerância à glicose bem como redução do glicogênio hepático. Em aortas, não foram observadas diferenças entre os grupos DG e ND na expressão proteica do RAGE e da Nox4. Contudo, no tecido cardíaco oriundo das proles DG, aos 12 e 18 meses de idade, foi observado aumento da expressão proteica de RAGE e da Nox4, aumento de ROS, redução dos níveis de nitritos e da atividade das enzimas

antioxidantes CAT e SOD, bem como dos níveis de GSH e GSSG. Foi observado uma redução da densidade dos capilares e aumento da densidade de colágeno no coração oriundo da prole DG aos 18 meses de idade. Em conclusão, a exposição intrauterina à hiperglicemia crônica programa distúrbios no metabolismo glicêmico e lipídico, com possível participação do RAGE e do desequilíbrio redox cardíaco, sem evidência a nível de aorta.

Palavras-chave: Diabetes gestacional. Estresse oxidativo. Estreptozotocina. NADPH oxidase.

ABSTRACT

Gestational Diabetes may induce changes in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, which may result in congenital malformations and the onset of cardiovascular diseases in adult life. Excess formation of advanced glycation end products (AGEs), binding to its receptor (RAGE), activation of nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B), as well as increased formation of reactive oxygen species (ROS), derived primarily from the various isoforms of NADPH-oxidases (Nox), are the mechanisms that link chronic hyperglycemia and cardiovascular changes demonstrated in animals and diabetic patients. Over the last few years, our research group has demonstrated an increase in plasma levels of AGEs in the offspring of diabetic dams at 4 months of age and an increase in the protein expression of RAGE and cardiac oxidative stress at 6 months of age. In the present study, was evaluated the time-dependent contribution of oxidative stress and RAGE in the development of cardiovascular complications in aortas at 3, 6 and 12 months and in hearts at 12 and 18 months of age of animals exposed to streptozotocin-induced gestational diabetes (STZ). For this, diabetes was induced on the seventh day of gestation with a single dose of STZ (50mg / kg, i.p.) dissolved in citrate buffer (vehicle). Female controls received only vehicle. The offspring were divided into two groups according to maternal treatment: non-diabetic control (ND) and gestational diabetes (DG). Experimental protocols for assessing plasma levels of glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol (HDL) and glycemic homeostasis were performed. The concentration of hepatic and muscular glycogen was determined by the anthrone method. Oxidative stress levels were verified through the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), as well as levels of reactive oxygen species (ROS), nitrite, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). The protein expression of RAGE and Nox4 were analyzed by Western blotting. The quantification of the volume of collagen and capillary density was evaluated by the histological technique. Exposure to changes in the intrauterine environment, caused by hyperglycemia, induced low birth weight that remained until adulthood. DG offspring showed a significant increase in triglyceride levels, glucose intolerance as well as hepatic glycogen reduction. In aortas, no differences were observed between the DG and ND groups in the protein expression of RAGE and Nox4. However, in cardiac tissue from DG at 12 and 18 months of age, increased RAGE and Nox4 protein expression, increased ROS, reduced levels of nitrites and the activity of CAT and SOD antioxidant enzymes were observed, as well levels of GSH and GSSG. A reduction in capillary density and an increase in the collagen volume fraction in the heart of DG offspring

at 18 months of age were observed. In conclusion, intrauterine exposure to chronic hyperglycemia program disorders in glycemic and lipid metabolism, with the possible participation of RAGE and cardiac redox imbalance, with no evidence at the aorta level.

Keywords: Gestational diabetes. Oxidative stress. Streptozotocin. NADPH oxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos de ação da estreptozotocina (STZ).	42
Figura 2 - Relação entre a hiperglicemia crônica e o desenvolvimento das complicações diabéticas.	47
Figura 3 – Representação esquemática das espécies reativas e dos antioxidantes.	53
Figura 4 - Representação das subunidades da NADPH oxidase.	54
Figura 5 - Representação da localização das enzimas Nox.	55
Figura 6 – Desenho experimental.	66
Figura 7 - Tolerância à glicose intraperitoneal e área sob a curva das proles aos 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 (D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, triângulos pretos) induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.) comparadas aos controles não diabéticos (ND, círculos abertos).	77
Figura 8 - Tolerância à insulina e constante de decaimento da glicose (KITT) das proles aos 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 (D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, triângulos pretos), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparados aos controles não diabéticos (ND, círculos abertos).	78
Figura 9 - Níveis plasmáticos de insulina pelo método de Elisa das proles aos 18 meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).	79
Figura 10 - Expressão proteica da Nox4 e do RAGE na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, colunas pretas), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos	81

controles não diabéticos (ND, colunas brancas).

Figura 11 - Expressão proteica da Nox4 e do RAGE no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, colunas pretas), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, colunas brancas). 82

Figura 12 - Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitritos na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 83

Figura 13 - Concentração de glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 84

Figura 14 - Razão da glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) na aorta das proles aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 85

Figura 15 - Atividade da superóxido dismutase e da catalase na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 86

Figura 16 - Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitritos no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 87

Figura 17 - Concentração de glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no 88

coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).

Figura 18 - Razão da glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no coração das proles aos 12 (A) e 18 (B) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparados aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 88

Figura 19 - Atividade da superóxido dismutase e da catalase no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparados aos controles não diabéticos (ND, coluna branca). 89

Figura 20 - Fotomicrografias de secções de corações da prole aos 18 meses de idade expostas ao diabetes induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.) no período intrauterino (DG, coluna preta e imagem B) e de controles não diabéticos (ND, coluna branca e imagem A). 90

Figura 21 - Desenho esquemático destacando o papel da glicose no aumento de RAGE, bem como no aumento do estresse oxidativo derivado da NADPH oxidase para o desenvolvimento das complicações cardiovasculares na prole de animais diabéticos. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.	27
Tabela 2 - Principais espécies reativas.	50
Tabela 3 - Principais antioxidantes.	51
Tabela 4 - Peso corporal (g) e perfil metabólico (mg/dL) da prole de ratos expostos ao diabetes gestacional (DG), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparado aos controles (ND), aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade.	76
Tabela 5 - Níveis de glicogênio hepático e muscular (%) da prole de ratos expostos ao diabetes gestacional (DG), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparada aos controles (ND), aos 3, 6, e 12 meses de idade.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
AGEs	produtos finais da glicação avançada
AMR	artérias mesentéricas de resistência
AP-1	ativador de proteína
ATP	trifosfato de adenosina
BB	Bio Breeding
DCV	doenças cardiovasculares
CAT	catalase
CETP	proteína de transferência de éster de colesterol
CMLV	células musculares lisas vasculares
COX-2	ciclooxigenase 2
DCV	doenças cardiovasculares
DEND	developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes
DG	Diabetes Gestacional
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERK	quinasas reguladas por sinal extracelular
e.v.	via endovenosa
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
GK	Goto Kakizaki
GLUT	transportador de glicose
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GSH	glutathione reduzida
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSSG	glutathione dissulfeto/ oxidada
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HPGH	hormônio de crescimento placentário humano
hPL	hormônio lactogênico placentário humano

IKK	quinase kappa b
IKB	proteína inibitória da família kappa B
JNK	c-Jun N-terminal -quinase
NIK	quinase indutora de NF-κB
IDL	lipoproteínas de densidade intermediária
IL	interleucina
i.p.	via intraperitoneal
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LLP	lipase lipoproteica
LPS	lipopolissacarídeos
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato oxidase
NF-κB	fator nuclear-kappa B
NLS	sinal de localização nuclear
NO•	óxido nítrico
NOD	Non Obese Diabetic
NOS	óxido nítrico sintase
Nox	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
O-GlcNAcase	O-β-D-N-acetilglicosaminidase
OLETF	Outsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PI3K	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato-3 cinase
PGE2	prostaglandina E2
PGF2α	prostaglandina F2α
RAGE	receptor para AGEs
RI	resistência à insulina
RL	radicais livres
ROS	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase
SRA	sistema renina angiotensina
sRAGE	RAGE solúvel
SNC	sistema nervoso central

Sp-1	proteína de especificidade 1
STZ	estreptozotocina
TG	triglicerídeos
TNF	fator de necrose tumoral
TOTG	teste oral de tolerância a glicose
TxA2	tromboxano A2
VCAM-1	moléculas de adesão vascular 1
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade
VSMCs	células do músculo liso vascular
ZDF	zucker diabetic fatty

LISTA DE SÍMBOLOS

Cu	cobre
Fe	ferro
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO ₂	hidroperoxila
Mn	manganês
O ₂ •-	radical superóxido
OH•	radical hidroxila
¹ O ₂	oxigênio singlete
ONOO-	peroxinitrito
ROOH	peróxidos orgânicos
ROH	álcool
Zn	zinco
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS.....	26
2.2 DIABETES MELLITUS: MÉTODOS E CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO.....	26
2.3 CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO DIABETES MELLITUS	27
2.4 RELAÇÃO ENTRE AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E O DIABETES	30
2.5 PROGRAMAÇÃO FETAL.....	33
2.6 FISIOPATOLOGIA DO DG.....	34
2.6.1 Repercussões fetais e neonatais	35
2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES	36
2.7.1 Modelos genéticos de diabetes	37
2.7.2 Outros modelos de diabetes	38
2.7.3 Estreptozotocina e a indução do diabetes experimental	39
2.7.3.1 Estrutura química e mecanismos de ação	39
2.7.3.2 Administração da estreptozotocina.....	42
2.7.3.3 Doses diabetogênicas da estreptozotocina.....	44
2.8 MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DO DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES	46
2.8.1 O estresse oxidativo	47
2.8.1.1 Espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes.....	49
2.8.2 A NADPH oxidase: estrutura e isoformas.....	53
2.8.3 O receptor RAGE	57
2.8.3.1 A interação AGEs-RAGE.....	58
2.8.3.2 A via do poliol e a via da PKC	60
3 OBJETIVOS	62
3.1 GERAL.....	62
3.2 ESPECÍFICOS.....	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.1 ANIMAIS	63
4.2 FÁRMACOS E REAGENTES	63
4.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	64
4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TTGip).....	65

4.5	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (TTIip).....	66
4.6	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	67
4.7	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	67
4.8	DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR	68
4.9	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	69
4.9.1	Preparação do homogenato e quantificação de proteínas	69
4.9.2	Avaliação dos níveis de glutathione (GSH)	69
4.9.3	Avaliação dos níveis de glutathione oxidada (GSSG).....	70
4.9.4	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	70
4.9.5	Quantificação das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	71
4.9.6	Atividade enzimática da catalase (CAT)	71
4.9.7	Atividade total da superóxido dismutase (SOD).....	72
4.10	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA PELA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOT</i>	72
4.11	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E DENSIDADE CAPILAR	73
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
5	RESULTADOS	75
5.1	VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	75
5.2	EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE O PESO CORPORAL DA PROLE AO NASCIMENTO, AOS 3, 6, 12 E 18 MESES DE IDADE	75
5.3	EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS DAS PROLES ADULTAS	75
5.4	EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL (TTGIP) E TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA (TTIIP) NAS PROLES ADULTAS	76
5.5	EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS NÍVEIS DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR NA PROLE AOS 3, 6 E 12 MESES DE IDADE	79
5.6	EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA DA NOX4 E DO RAGE EM AORTAS DAS PROLES AOS 3, 6 E 12 MESES DE IDADE E NO CORÇÃO DA PROLE AOS 12 E 18 MESES DE IDADE	80
5.7	EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM AORTAS DA PROLE AOS 3, 6 E 12 MESES DE IDADE E NO CORÇÃO DA PROLE AOS 12 E 18 MESES DE IDADE	82

5.8 DENSIDADE DOS CAPILARES E FRAÇÃO DE VOLUME DE COLÁGENO NO CORAÇÃO DA PROLE AOS 18 MESES DE IDADE.....	89
6 DISCUSSÃO	91
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE A - ARTIGO	143
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE	171

1 INTRODUÇÃO

O diabetes gestacional (DG) é associado a complicações que afetam a mãe e o feto como por exemplo: maior incidência de parto cesariana, eclampsia, distocia, macrosomia, hipoglicemia neonatal e morte perinatal. Possui incidência mundial de 10 a 25% (JIWANI et al, 2012; WHO, 2016) e pode apresentar grandes variações devido à heterogeneidade étnica entre diferentes populações estudadas, bem como pelos critérios diagnósticos utilizados. A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estima que um em cada seis nascidos (16,8%) são oriundos de mães com algum tipo de hiperglicemia na gravidez (ADA, 2015; IDF Diabetes Atlas, 2013). No Brasil, a prevalência do DG é estimada em 3% a 8% das gestantes (REICHELT et al., 1998; VALLADARES; KONKA, 2008; SHMITT et al., 2009; MASSUCATTI; PEREIRA; MAIOLI et al., 2012; SANTOS et al., 2012; JACOB et al., 2014).

A Pesquisa Nacional de Saúde em 2013 revelou que 4,2% ou seja, 6,1 milhões de brasileiros com 18 anos ou acima dessa idade possuíam alguma doença cardiovascular (DCV) (MS, 2014). Estudos epidemiológicos, pré-clínicos e clínicos, evidenciam a forte relação entre a exposição à hiperglicemia durante o período gestacional e uma maior susceptibilidade da prole ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (PRIEST et al., 2015; BURLINA et al., 2016) como as DCV, consideradas a principal causa de morte no Brasil e no mundo (WHO, 2016). Esta relação suporta a hipótese da “programação intrauterina das doenças crônicas” ou “programação fetal”, proposta por Barker e colaboradores (1989 a,b), as quais sugerem que estímulos, como a hiperglicemia materna, ocorridos durante determinados períodos críticos do desenvolvimento, podem trazer consequências a curto ou longo prazo na estrutura ou função dos órgãos e tecidos da prole (BARKER, 1995; 2007; MARTINS et al., 2014; PETROPOULOS et al., 2015).

Evidências experimentais demonstram a associação entre a hiperglicemia e o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) na patogênese das complicações maternas e fetais (DAMASCENO et al., 2002; ZANGEN et al., 2002; CERIELLO, 2003; MONNIER; SELL; GENUTH, 2005; FOLLI et al., 2011; TOPCUOGLU et al., 2015; ORNOY et al., 2015). Embora múltiplos sistemas enzimáticos produzam ROS no sistema cardiovascular, a NADPH oxidase (Nox) é a principal fonte destas substâncias, tanto em células endoteliais como nas musculares lisas (LASSEGUE; GRIENDLING, 2009; ZHANG et al., 2013). Os homólogos da NADPH oxidase, Nox1, Nox2 e Nox4 são os principais envolvidos na patogênese das complicações micro e macrovasculares presentes no diabetes (LASSÈGUE; GRIEDLING,

2010; YOKOYAMA; INOUE, 2004; PARAVICINI et al., 2002; USHIO-FUKAI, 2006; RABÊLO et al., 2010). A hiperglicemia e a geração de um desequilíbrio redox, causado por aumento da atividade da NADPH oxidase, podem ativar cascatas celulares, comprometer a função e a estrutura de proteínas, causar alterações nos fosfolípidios de membranas (peroxidação lipídica), bem como promover a oxidação das bases dos ácidos nucleicos (SHEN, 2010).

Como resultado da hiperglicemia crônica, do estresse oxidativo e da dislipidemia ocorre a formação de produtos de Amadori e seus produtos finais de glicação avançada (AGEs) que, por meio da interação com o receptor RAGE, ativam a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) estimulando a produção de citocinas inflamatórias como a interleucina-1 beta (IL-1 β), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (REDDY; NATARAJAN, 2011). Neste contexto, o aumento do estresse oxidativo desempenha um papel chave na doença vascular associada ao diabetes, sendo observado, por exemplo, que a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, reduz as alterações promovidas por AGEs nas células musculares lisas vasculares (CMLV) da aorta, através da redução do NF- κ B, o que pode ser um atrativo como estratégia terapêutica para o diabetes Mellitus (DM) (SILVA et al., 2015).

Os mecanismos que envolvem as complicações cardiovasculares do diabetes são complexos e ainda pouco esclarecidos, apesar dos vários grupos de pesquisa que atuam nessa área. Na tentativa de contribuir nessas investigações, ao longo dos últimos anos, nosso grupo mostrou que o DG induz alterações funcionais na prole, como redução da atividade dos canais para K⁺ na aorta (PORTO et al., 2010) e participação de derivados prostanóides da ciclooxygenase 2 (COX-2), em artérias de resistência (mesentéricas), o que poderia contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial na prole adulta (RAMOS-ALVES et al., 2012a).

Mais recentemente, da Silva (2015), observou que a pressão arterial média, o tônus simpático e o índice de hipertrofia ventricular estavam elevados na prole oriunda de mães com DG, aos 12 e 18 meses de idade. Esse aumento de pressão arterial foi corroborado por De Queiroz e colaboradores (2015), que demonstraram que a inervação simpática está aumentada na artéria mesentérica de animais expostos ao DG. Ademais, uma elevação da produção de ROS e da expressão proteica de RAGE e Nox4, bem como redução da atividade enzimática antioxidante foi observado por Teixeira-Silva (2015) no tecido cardíaco oriundo da prole aos 6 meses de idade. Considerando a relação entre os níveis elevados de AGEs e a ativação do seu receptor RAGE, os quais são resultantes da hiperglicemia e, que a Nox4 é a isoforma da

NADPH oxidase mais abundante no coração e na vasculatura, a hipótese deste trabalho é que o aumento tempo-dependente do RAGE e da Nox4 tem uma participação importante na gênese e/ou manutenção do estresse oxidativo da prole diabética, o que contribui para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares e metabólicas, e desta forma revelando-se importantes alvos terapêuticos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS

Caracterizado por hiperglicemia crônica, o Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome crônico-degenerativa de etiologia múltipla, decorrente de desordens endócrino-metabólicas associadas a distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, bem como à deficiência parcial ou total da secreção de insulina, ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos (ADA, 2015; WHO, 2016).

O DM com prevalência global entre adultos com mais de 18 anos de idade, aumentou de 108 milhões (4,7%) em 1980 para 422 milhões (8,5%) em 2014 (WHO, 2016) sendo considerado uma das principais causas de óbito em países desenvolvidos. Este aumento no número de diabéticos deve-se, a uma maior urbanização e alterações no estilo de vida, em particular no padrão alimentar, sedentarismo, crescimento e envelhecimento populacional (SBD, 2016). Devido a sua natureza crônica, a gravidade de suas complicações e os meios necessários para controlá-las, o DM é considerado um grande problema de saúde pública mundial (WHO, 2016).

A prevalência de diabetes no Brasil é de 8,1% (16 milhões de adultos) (WHO, 2016). O Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil evidenciou a influência da idade na prevalência de DM e observou um incremento de 2,7% na faixa etária de 30 a 59 anos para 17,4% na faixa de 60 a 69 anos (aumento de 6,4 vezes) (MALERBI; FRANCO, 1992). Em 2013, a Pesquisa Nacional de Saúde – PNS estimou que no Brasil 6,2% da população com 18 anos ou mais de idade apresentaram diagnóstico médico de diabetes. A WHO (2016) estima que em 2030 o diabetes ocupará o sétimo lugar entre as principais causas de morte no mundo. No estado de Pernambuco foram registrados até julho de 2013, 135.454 casos o que corresponde a 1.867,29 casos por 100 mil habitantes, comparados a média nacional de 2.276,51 casos por 100 mil habitantes (SIAB, 2013).

2.2 DIABETES MELLITUS: MÉTODOS E CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO

Os pacientes com diabetes são caracterizados por um quadro clássico, conhecido como “os 4 Ps”, apresentando as seguintes manifestações clínicas: poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso (BRASIL, 2006).

De acordo com a “American Diabetes Association” (ADA) (2016), aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), são três os critérios aceitos para o diagnóstico do DM com utilização da glicemia:

1. Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia plasmática casual ≥ 200 mg/dL (glicemia casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições);
2. Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L). Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia (O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 8 h);
3. Glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose por via oral ≥ 200 mg/dL após 120 minutos da ingestão.

Pacientes com glicemia ≥ 126 mg/dL durante o jejum ou ≥ 200 mg/dL no teste de tolerância oral a glicose (TOTG) ou em qualquer hora do dia, podem ser considerados diabéticos desde que os valores encontrados sejam confirmados em outro dia.

Desde 2010, os novos padrões da ADA, incluem a utilização de hemoglobina glicada (HbA1c) como método diagnóstico para o DM, sendo considerado diabético o paciente com nível de HbA1c igual ou superior a 6,5%. Valores entre 5,7% e 6,4% são indicativos de alto risco para o desenvolvimento de diabetes. Os critérios de diagnóstico para DM estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.

Categoria	Jejum	2h após a ingestão de glicose	Glicose casual
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	≥ 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes mellitus	≥ 126	≥ 200	≥ 200 acompanhada de sintomas clássicos

Fonte: SBD, 2016.

2.3 CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO DIABETES MELLITUS

A classificação etiológica do DM foi normatizada pela National Diabetes Data Group (NDDG) em 1979, porém atualmente a mais utilizada, é a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA,

2016), preconizada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2016), segundo a qual há quatro categorias clínicas: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de diabetes e diabetes gestacional (DG). Há ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias constituem fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (DCV).

O DM1, anteriormente conhecido como diabetes infanto-juvenil ou diabetes insulínodépendente, é caracterizado pela destruição das células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas. Pode ser causado por processos autoimunes que correspondem entre 5% e 10% dos casos (tipo 1A) ou desconhecidos (forma idiopática ou tipo 1B). Os indivíduos com esse tipo de DM podem apresentar sintomas como polifagia, poliúria, polidipsia, perda de peso, visão turva e fadiga (SBD, 2016; WHO, 2016).

O DM2 corresponde entre 90% a 95% dos casos de diabetes no mundo sendo caracterizado por uma alteração na regulação dos transportadores de glicose, presentes no tecido periférico e hepático, à insulina. Defeitos na ação ou secreção de insulina (insulinopenia) associada ou não a resistência a insulina (RI) podem estar presentes (MCLELLAN et al. 2007), bem como redução na massa de células β pancreáticas (BUTLER et al., 2003). Os sintomas se assemelham ao DM1, mas muitas vezes estão ausentes ou relativamente menos aparentes, o que faz com que a doença se torne silenciosa por vários anos, até que as complicações se desenvolvam. É importante ressaltar que, o DM2 é principalmente diagnosticado em adultos acima de 40 anos, mas pode ocorrer em qualquer idade, até mesmo em crianças, decorrente da obesidade (WHO, 2016). Em um estudo recente foi observado que a obesidade infantil quadruplica o risco de diabetes tipo 2 (ABBASI et al., 2017).

Estão incluídos na categoria clínica “outros tipos específicos de diabetes”, os defeitos genéticos na função das células β pancreáticas, os defeitos genéticos na ação da insulina, bem como as doenças do pâncreas exócrino (SBD, 2016).

As formas de diabetes associadas a defeitos genéticos na função das células β incluem MODY, diabetes neonatal e diabetes mitocondrial (formas monogênicas). O MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), representa 1 a 2% de todos os casos de DM e caracteriza-se pela mutação em um único gene, que é transmitido de forma autossômica-dominante e suficiente para promover a hiperglicemia (LOWE, 2001). Há vários tipos de MODY, cada um associado a um gene diferente, por exemplo: MODY 1 – mutação no gene HNF4A, MODY 2 – mutação no gene GCK, MODY 3 – mutação no gene HNF1A, MODY 4

– mutação no gene IPF1. O início da doença é frequentemente precoce, em geral antes dos 25 anos de idade, e ocorre na presença de concentrações normais ou reduzidas de insulina (SBD, 2016).

O diabetes neonatal pode ser diagnosticado nos seis primeiros meses de vida sendo considerado uma forma monogênica que pode ser transitória ou permanente. Quando transitória, a remissão ocorre em semanas ou meses e a recidiva pode acontecer na puberdade. Os pacientes afetados apresentam baixo peso ao nascimento e a hiperglicemia desenvolve-se nas primeiras semanas de vida. Este tipo de diabetes pode estar acompanhado de alterações neurológicas, como retardo do desenvolvimento, epilepsia e fraqueza muscular, conhecida como síndrome DEND (acrônimo em inglês de *developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes*) (POLAK; CAVÉ, 2007).

O diabetes mitocondrial é um tipo raro de diabetes, com prevalência de aproximadamente 0,5 a 3%, dependendo do grupo populacional estudado (SALLES et al., 2007; MAASSEN et al., 2004). É associado, geralmente, a uma mutação do gene A3243G na mitocôndria. A mutação ocorre com a substituição de adenina por guanina na posição 3243 do gene do RNA transportador (Leu, UUR), codificado pelo DNA mitocondrial. O diabetes mitocondrial é caracterizado pela redução na produção de insulina e não pela resistência da mesma. O mecanismo molecular que interfere na produção de insulina envolve atenuação dos níveis de ADP/ATP citossólicos. A deterioração das funções pancreáticas é dependente da idade, tendo como uma possível explicação à hiperglicemia induzida por radicais livres e os danos oxidativos as células β (MAASSEN et al., 2004; SIVITZ, et al., 2010).

Em relação aos defeitos genéticos na ação da insulina, estes podem ser ocasionados por mutações no gene do receptor deste hormônio. É caracterizado por RI, retardo no crescimento intrauterino e pós-natal além de diminuição do tecido adiposo subcutâneo. É importante ressaltar que a pancreatite, trauma, pancreatectomia e carcinoma pancreático, também podem levar ao diabetes (SBD, 2016).

Pouco se sabe sobre a relação entre as doenças do pâncreas exócrino e o desenvolvimento de diabetes. Para Hardt e Ewald (2011) o diabetes pode ser causado por doenças exócrinas pancreáticas e a própria insuficiência pancreática exócrina também pode ser causada pelo diabetes, visto que ambas são condições inflamatórias. O pâncreas exócrino é responsável pela produção de enzimas que auxiliam na digestão. Quando ocorre alguma alteração pancreática de forma que a produção dessas enzimas digestivas e principais ductos são bloqueados, como na pancreatite e na insuficiência pancreática crônica, a má digestão poderia comprometer a produção de incretinas, resultando na redução da liberação de insulina

(CUMMINGS, 2014; PICIUCCHI et al., 2015). Além disso, complicações diabéticas como a neuropatia diabética, também poderia interferir na sinalização de células pancreáticas e neurônios que desempenham funções exócrinas (HARDT; EWALD, 2011).

O DG ocorre quando há uma intolerância à glicose de graus variados de intensidade tem início ou só é diagnosticada durante a gravidez, podendo ou não persistir após o parto (WHO, 1999). Esse tipo de diabetes cresceu e atingiu proporções globais nas últimas décadas, acompanhando o aumento do DM2 e da obesidade (LAAKSONEN et al., 2002). O DG representa cerca de 90% de todos os casos de DM na gestação (NIELSEN et al., 2014). Entretanto, sua incidência varia de acordo com a população estudada – diferenças associadas a idade materna e origem étnica – bem como o método diagnóstico utilizado (IDF, 2009; ADA, 2015). A gravidez diabética, caracteriza-se por numerosos distúrbios na mãe, bem como no crescimento e desenvolvimento fetal/neonatal. Os fatores de risco associados ao DG incluem idade, sobrepeso ou obesidade, ganho de peso excessivo durante a gravidez, antecedente familiar de diabetes, DG em gravidez anterior, história de morte fetal ou anomalia congênita e glicosúria durante a gravidez (ANNA et al., 2008).

2.4 RELAÇÃO ENTRE AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES E O DIABETES

As DCV são a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2016). Estima-se que, em 2012, 17,5 milhões de pessoas morreram de DCV e que em 2030 esse número será de aproximadamente 23,6 milhões de pessoas (WHO, 2011, 2016). Segundo o cardiômetro da Sociedade Brasileira de Cardiologia, um indicador do número estimado de mortes por DCV no Brasil, no ano de 2016 ocorreram 349.938 óbitos por DCV. No período de janeiro a junho de 2017, as DCV foram responsáveis por aproximadamente 179.510, o que corresponde a aproximadamente 716 mortes por dia (www.cardiometro.com.br).

As DCV são classificadas em: doença coronariana; doença arterial periférica; doença cerebrovascular; cardiopatia congênita; trombose venosa profunda e embolia pulmonar e doença cardíaca reumática. Há também outras DCV, como os tumores cardíacos, doenças valvulares e a cardiomiopatia (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2014). Os fatores de risco envolvidos na fisiopatologia das DCV, podem ser divididos em duas categorias: os fatores de risco modificáveis e os não modificáveis. Dentre os fatores de risco não modificáveis encontram-se o sexo, a idade e os fatores genéticos. Dentre os modificáveis encontram-se: a dislipidemia, tabagismo, alcoolismo, tipo

de dieta, obesidade, hipertensão, sedentarismo e diabetes. Outros fatores que também contribuem para o desenvolvimento das DCV são a desigualdade socioeconômica e o nível de escolaridade (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2014).

As DCV representam a principal causa de morte (50 a 80%) em indivíduos diabéticos (STAMLER et al., 1993; SARWAR et al., 2010). Pacientes com DM2 têm risco 2 a 4 vezes maior de mortalidade por DCV comparados a indivíduos não diabéticos (SBD, 2014). Além disso, estima-se que, pacientes diabéticos tenham uma redução na expectativa de vida de 4 a 8 anos, em comparação a indivíduos não diabéticos (HUO et al., 2016), eles também apresentam pior prognóstico, menor sobrevida a curto prazo, maior risco de recorrência da doença, menor resposta a tratamentos cirúrgicos e maior risco de desenvolver insuficiência cardíaca congestiva e aumento da incidência de complicações crônicas associadas a esta epidemia (BLOOMGARDEN, 1997; RAWSHANI et al., 2017a).

O estudo de coorte de Framingham reconheceu o diabetes como um importante fator de risco para o desenvolvimento das DCV (KANDEL; MCGEE, 1979). Contudo, o impacto da hiperglicemia na morbidade e mortalidade cardiovascular foi comprovado pelo estudo finlandês de Haffner e colaboradores em 1998, no qual atribuíram ao DM2 o termo “risco coronariano equivalente”. Neste estudo, pacientes diabéticos sem história de doença coronária prévia apresentaram mortalidade coronária semelhante aos pacientes não diabéticos que tinham sofrido evento coronariano prévio. Desse modo, nos dias atuais, reconhece-se que o diabetes não apenas aumenta a incidência das DCV, como também acelera o seu curso clínico (ROSAMOND et al., 1998; BECKMAN; CREAGER; LIBBY, 2002; MARTÍN-TIMÓN et al., 2014).

Alguns estudos, com pacientes e animais diabéticos, demonstraram a relação direta entre a hiperglicemia crônica e as complicações micro e macrovasculares (CHAWLA; CHAWLA; JAGGI, 2016; MAHFOZ et al., 2016; MATSUURA et al., 2017; RAWSHANI et al., 2017b; PIEME et al., 2017; WANG et al., 2017). As complicações microvasculares são resultantes de alterações nos pequenos vasos sanguíneos dos olhos, rins e nervos, resultando em retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas (NGUYEN; SHAW; GRANT, 2012). A retinopatia diabética possui uma prevalência mundial de 17,6 a 33,2% entre pacientes diabéticos (YAU et al., 2012) e constitui a principal causa da cegueira irreversível entre esses pacientes com idade de 20 a 75 anos. Sua incidência está relacionada a duração e ao controle da hiperglicemia (CIULLA; AMADOR; ZINMAN, 2003; FONG et al., 2004). A retinopatia diabética pode ser classificada em proliferativa e não proliferativa. A primeira é caracterizada pelo aparecimento de neovasos devido a isquemia retiniana, enquanto que a retinopatia não

proliferativa é identificada pela presença de microaneurismas, micro-hemorragias e exsudatos. A progressão da doença pode levar a redução da perfusão capilar, hemorragias e anormalidades intrarretinianas, bem como alterações no calibre venoso (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2011).

A nefropatia diabética afeta 20% a 30% das pessoas com DM1 ou DM2, correspondendo de 30 a 47% dos casos de insuficiência renal (ANDERSEN et al., 1983; MOLITCH et al., 2004; NGUYEN; SHAW; GRANT, 2012). O estágio inicial da nefropatia diabética é caracterizado por microalbuminúria (excreção de albumina 30-300 mg / 24 horas). A progressão da doença é marcada por macroalbuminúria ou proteinúria (> 500 mg/ 24 horas), redução da taxa de filtração glomerular, alterações estruturais como espessamento das membranas glomerulares, acúmulo de matriz extracelular e lesão tubulointersticial, que juntos culminam na insuficiência renal (MAUER et al., 1984; BRITO et al., 1998; KATZ et al., 2002; MAUER; DRUMMOND, 2002).

A neuropatia diabética afeta 40 a 50% dos indivíduos diabéticos (BOULTON et al., 2005; BANSAL; KALITA; MISRA, 2006). Ela é identificada pelas alterações estruturais e funcionais das fibras nervosas sensitivas, motoras e autonômicas (DAVIES et al., 2006; VINIK, 2016). O pé diabético é uma consequência das alterações vasculares em membros inferiores devido a doença vascular periférica e/ou complicações neuropáticas. A neuropatia diabética é responsável por 40% a 60% de todas as amputações não traumáticas de membros inferiores realizadas em pacientes diabéticos (IWGDF, 2015; FOWLER, 2008).

A nível macrovascular, destacam-se as complicações que afetam os grandes vasos do coração, cérebro e membros inferiores, levando a doença coronariana, a doença cerebrovascular e a doença vascular periférica (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). A aterosclerose constitui a principal responsável pela gênese desses eventos macrovasculares que afeta a camada íntima de artérias de grande e médio calibre, como a aorta, as carótidas, as artérias periféricas dos membros e as artérias coronarianas (MONTECUCCO; MACH, 2009; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; CHRISTERSSON; THULIN; SIEGBAHN, 2017; DE ROSA et al., 2017; WANG; ZHANG, 2017). No processo aterosclerótico, a disfunção endotelial constitui o principal evento desencadeante das alterações vasculares, contribuindo com a liberação de citocinas inflamatórias, fatores quimiotáticos e de crescimento (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; DAVIGNON; GANZ, 2004).

2.5 PROGRAMAÇÃO FETAL

A “origem fetal das doenças no adulto” também conhecida como “teoria de Barker”, surgiu no final da década de 80, a partir de estudos realizados pelo cientista David Barker (BARKER; OSMOND, 1986; BARKER et al., 1989; BARKER et al., 1993). Na Inglaterra, no início do século XX, entre 1968 e 1978, Barker e seus colaboradores observaram que as maiores taxas de mortalidade infantil estavam associadas ao baixo peso ao nascimento e aos maiores índices de mortalidade por doenças coronarianas nos 50 anos subsequentes (BARKER; OSMOND, 1986). A teoria de Barker sustenta o conceito de “plasticidade do desenvolvimento”, o qual seria a capacidade de um fenótipo originar diversos estados morfológicos ou fisiológicos em resposta a diferentes efeitos epigenéticos durante o desenvolvimento (BARKER, 2007). Essas adaptações em órgãos e tecidos aconteceriam durante períodos críticos do desenvolvimento fetal, os quais coincidem com a vida intra-uterina, uma fase de rápida divisão celular (WIDDOWSON; MCCANCE, 1975).

Dentre as hipóteses que tentam explicar a origem intra-uterina das doenças do adulto, a mais aceita é a da “programação fetal”, segundo a qual estímulos ou condições gestacionais adversas, ocorridas durante períodos críticos do desenvolvimento intrauterino, poderiam resultar em alterações metabólicas e anatomofisiológicas, as quais aumentariam o risco de desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (BARKER et al., 1989).

Estudos epidemiológicos e experimentais evidenciaram a forte relação entre a exposição a esses estímulos e as consequências a curto e longo prazo na prole, contribuindo para o surgimento de algumas doenças, como a obesidade (KENSARA; WOOTTON; PHILLIPS, 2005; TSADOK et al., 2011), a síndrome metabólica (MARCINIAK et al., 2017), a hipertensão (RAMOS-ALVES et al., 2012a; DE SÁ et al., 2017) e o diabetes (DABELEA et al., 2000; FRANKS et al., 2006; CLAUSEN et al., 2008).

Inicialmente, a maioria dos estudos, sobre as condições gestacionais potencialmente causadoras de alterações fetais, enfatizava principalmente o efeito da desnutrição materna (LAW et al., 2002; CAMPISANO et al., 2017). Contudo, atualmente existem inúmeros trabalhos que demonstram a relação entre a exposição ao diabetes gestacional e o aparecimento de distúrbios metabólicos, neurais e principalmente cardiovasculares no período pós-natal (BRINCIOTTI et al., 2011; HAY, 2012; BURLINA et al., 2016; MOEN et al., 2017).

2.6 FISIOPATOLOGIA DO DG

Durante a gestação, ocorrem diversas adaptações fisiológicas e alterações endócrino-metabólicas, a fim de proporcionar um ambiente ideal para o feto em desenvolvimento (KING, 2000). O fluxo sanguíneo placentário, responsável pela troca materno-fetal, fornece ao feto oxigênio e nutrientes (SHAFRIR; BARASH, 1987). Por conseguinte, a placenta também produz hormônio lactogênico placentário humano (hPL), progesterona, estrogênios e hormônio de crescimento placentário humano (hPGH) que podem interferir na produção de insulina e modificar a utilização da glicose, podendo afetar a mãe e o feto de forma independente (HERRERA et al., 1985; JANSSON et al., 2006; SCHRAENEN et al., 2010).

Na primeira metade da gestação humana ocorre à inibição da alanina, um precursor do glicogênio, os níveis crescentes de estrógeno e progesterona provocam hiperplasia das células β pancreáticas com aumento na secreção e sensibilidade a insulina, e consequentemente redução das concentrações circulantes de glicose (CODNER, 2008). Entretanto, na segunda metade do ciclo gestacional, conhecida como fase catabólica, ocorre queda da sensibilidade periférica do organismo materno a ação da insulina. A hiperglicemia resultante, tem por objetivo assegurar a adequada disponibilidade da glicose para atender a crescente demanda metabólica do conceito, visto que cerca de 70% do crescimento fetal ocorre no final da gravidez (NANDI et al., 2010). Em ratos da linhagem Wistar, o pico dessas adaptações ocorre em torno do 14º dia de gestação (NIEUWENHUIZEN et al., 1997). Paralelamente, impõe-se a necessidade fisiológica de uma maior produção e liberação de insulina pelo pâncreas materno, como tentativa de manter a concentração de glicose em níveis normais e garantir o aporte energético necessário para o feto (DOBLADO et al., 2007). Ocasionalmente, portanto, diminuição da tolerância à glicose, hiperinsulinismo e consequentemente RI, o que está relacionado ao hormônio lactogênico placentário - antagonista insulínico cuja concentração se eleva de forma proporcional ao crescimento da placenta. A incapacidade do pâncreas em responder ao aumento da demanda fisiológica a insulina, favorece o quadro de hiperglicemia de intensidade variada e desenvolvimento do DG (LANGER; CONWAY, 2000). É importante ressaltar que em humanos, o pâncreas fetal se forma na 10ª semana da gestação, e em ratos da linhagem Sprague-Dowley, o desenvolvimento de células β pancreáticas ocorre principalmente durante a última semana de crescimento fetal (BLONDEAU; BREANT, 2005).

Os mecanismos relacionados com a hipofunção das células β pancreáticas resultam de diversos fatores, como doença autoimune, causas monogênicas e RI. Esta última pode estar relacionada ao aumento da adiposidade materna, ingestão calórica e aumento dos níveis séricos dos ácidos graxos, glicocorticóides, hormônios tireoideanos, cortisol, estrogênio, prolactina e progesterona (LAPPAS et al., 2005), além dos efeitos insulino-dessensibilizantes causados pelos hPL, hPGH e por adipocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), leptina, adiponectina e resistina, produzidas pela placenta e pelo tecido adiposo materno (SFERRRUZZI-PERRI et al., 2011).

2.6.1 Repercussões fetais e neonatais

No DG, o comprometimento fetal decorre primordialmente pelos altos níveis de glicose materna, que alcança o conceito via placenta por difusão facilitada (RUDGE et al., 2011). A hiperglicemia materna, promove hiperplasia e hiperatividade das células do pâncreas fetal, resultando em hiperinsulinemia, sendo o excesso de glicose captado pelas células dos tecidos fetais e transformado em gordura, resultando em macrossomia (RUDGE et al., 2011). Todavia, a super-estimulação, pode levar a exaustão das células β fetais e resultar em hipoinsulinemia fetal e neonatal. A redução no número de receptores de insulina nas células-alvo levam a uma diminuição da captação de glicose para o feto. Desta forma, o crescimento do feto e a síntese de proteínas são suprimidos, conduzindo a microssomia fetal. O desenvolvimento pós-natal é retardado nesses animais que podem permanecer pequenos até a idade adulta, além de desenvolverem RI (AERTS; HOLEMANS; VAN ASSCHE, 1990; HOLEMANS; AERTS; VAN ASSCHE, 1991; VAN ASSCHE; HOLEMANS; AERTS, 2001, SEGAR et al., 2009; RAMOS-ALVES et al., 2012a).

As malformações causadas pelo DG são multifatoriais e poligênicas, podendo comprometer todos os sistemas, sendo o cardiovascular e o renal os mais afetados (GILL-RANDALL et al., 2004; WEST et al., 2011). Contudo, dependendo do tempo de exposição (embrionário e fetal) a hiperglicemia, pode-se acarretar diferentes efeitos. No início do primeiro trimestre, pode ocorrer restrição do crescimento intrauterino e teratogênese. Durante o segundo trimestre, estão presentes as alterações cerebrais, comportamentais, intelectuais ou psicológicas. E no terceiro trimestre, a proliferação anormal de adipócitos e células musculares fetais, em conjunto com hiperplasia pancreática das células β , bem como das

células neuroendócrinas podem ser as responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade, hipertensão e DM2 na vida adulta (HOD et al., 2015).

Estudos experimentais e clínicos demonstraram que a exposição intrauterina à hiperglicemia materna predispõe a prole ao desenvolvimento de DM2 (ALCOLADO et al., 2002; JONES; OZANNE, 2007), dislipidemia (MERZOUK et al., 2000), obesidade (PETTITT et al., 1983; DABELEA, 2007), alteração na reatividade vascular (HOLEMANS et al., 1999; ROCHA et al., 2005; RAMOS-ALVES et al., 2012a), hipertensão (NEHIRI et al., 2008; KATKHUDA et al., 2012) e diminuição da sensibilidade/secreção de insulina (SEGAR et al., 2009; BLONDEAU, 2011).

2.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES

Os modelos animais confirmam os dados epidemiológicos humanos e elucidam os mecanismos da programação intrauterina, como as alterações no desenvolvimento de órgãos e tecidos, nas respostas de sinalização celular, bem como modificações epigenéticas. O diabetes foi descrito em várias espécies animais como camundongos, ratos, suínos, ovelhas, coelhos, macacos e cães (CAVELLERO; MOSCA, 1953; ABELOVE; PASCHIKS, 1954; KERN; LOGOTHETOPOULO, 1970; LIKE; CHICK, 1974; PASEK; GANNON, 2013). No entanto, os modelos experimentais mais utilizados são os de roedores, especialmente os ratos das linhagens Wistar e Sprague-Dawley devido à facilidade de criação e manutenção, curto período de prenhez e multiparidade, o que possibilita o estudo sobre múltiplos fetos e suas gerações.

Todavia, os ratos apresentam diferenças fisiológicas em comparação aos humanos em relação ao diâmetro dos vasos, ao ritmo cardíaco, as forças hemodinâmicas (BRUCE; TALL, 1995; VANDERLAAN et al., 2004) e ao metabolismo das lipoproteínas (BRESLOW, 1996). Os roedores não possuem a proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), produzida principalmente no fígado e no tecido adiposo, a qual desempenha um importante papel na transferência do éster de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLs) para outras lipoproteínas (VLDL, IDL e LDL) em troca de triacilglicerol (BRUCE; TALL, 1995). Nos seres humanos, uma deficiência genética da CETP leva ao aumento do colesterol HDL e a um estado antiaterogênico (BRUCE; TALL, 1995). Quando alimentados com dieta padrão, os roedores apresentam baixos níveis de colesterol plasmáticos (<2,5mmol/l) contidos principalmente na fração antiaterogênica da HDL e, portanto, não desenvolvem placas

ateroscleróticas, mesmo sendo alimentados com dietas hiperlipídicas por um longo período de tempo.

Embora os roedores apresentem resistência ao desenvolvimento de complicações macrovasculares, como a aterosclerose, eles são muito utilizados no estudo das complicações microvasculares (HEINONEN et al., 2015). Desse modo, o diabetes e suas complicações cardiovasculares também podem ser avaliados em modelos induzidos experimentalmente ou em modelos que apresentem modificações genéticas.

2.7.1 Modelos genéticos de diabetes

- i. Camundongo diabético não obeso (NOD – Non Obese Diabetic) e o rato BioBreeding (BB): nestes modelos, há a destruição autoimune das ilhotas pancreáticas pelas células T, células B e macrófagos, semelhante ao que ocorre no DM 1 em humanos (KAY et al., 2000). O NOD desenvolve diabetes leve com 100 a 200 dias de vida, perda de peso, poliúria, polidipsia e hiperglicemia). Sem tratamento com insulina exógena, sobrevivem de 3 a 4 semanas após a primeira detecção de glicosúria (KAY et al., 2000). Os ratos BB desenvolvem diabetes grave (início: 40-200 dias) com hipoinsulinemia, hiperglicemia, glicosúria, perda de peso, polidipsia, poliúria e cetoacidose (NAKHOODA et al., 1977; ONUTA et al., 2008; HEINONEN et al., 2015).
- ii. Rato Goto-Kakizaki (GK): trata-se de um modelo de diabetes não obeso, normolipídico e resistente a insulina (CALDERARI et al., 2007).
- iii. Camundongo amarelo (Agouti Yellow): possui uma mutação de caráter autossômico dominante da proteína agouti, promovendo hiperfagia, redução na termogênese, hiperinsulinemia, obesidade, diabetes e pelagem amarela a esses animais (DOLINOY, 2008).
- iv. Ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF): apresentam alterações nos receptores da leptina. Desenvolvem obesidade e sintomas de DM2 como: hiperglicemia entre a 7ª e 12ª semana de idade, RI, intolerância à glicose, aumento dos triglicerídeos plasmáticos, bem como dos níveis pressóricos (ZUCKER; ZUCKER, 1961; PETERSON et al., 1990; SCHMIDT et al., 2003).
- v. Camundongo KK: desenvolvem diabetes moderado, obesidade, hiperinsulinemia e hiperplasia de células β pancreáticas (SONE et al., 2001).

- vi. Ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLEFT): oriundos do cruzamento de fêmea Wistar com macho cinzento selvagem. Apresentam hiperfagia e obesidade, hiperglicemia (depois das 18 semanas de idade em machos e 70 semanas de idade em fêmeas), intolerância à glicose e hiperplasia pancreática (MORAN; BI, 2006).
- vii. Wistar Fatty Rat: primeiro modelo de DM2 e obesidade através do cruzamento entre o rato Zucker e o Wistar Kyoto. Somente machos desenvolvem DM 2, caracterizado por: hiperglicemia, hiperinsulinemia e RI (GREENE et al., 1994).
- viii. Camundongo db/db: constituem um modelo de DM2 que apresenta mutação autossômica recessiva em um único gene do cromossomo 4. Heterozigotos são obesos e diabéticos nos primeiros dois a três meses de vida (KAKU; PROVINCE; PERMUTT, 1989).
- ix. Rato Sand (*Psammomys obesus*): são ratos que se alimentam naturalmente de plantas de baixo valor calórico contendo alta concentração de sal. Tornam-se obesos e diabéticos quando alimentados com uma dieta padrão de laboratório (PATLAS et al., 2006).
- x. Camundongo Akita: é um modelo monogênico de DM1. Esses animais possuem uma mutação espontânea no gene 2 da insulina, produzindo toxicidade. Apresentam uma redução na massa das células β pancreáticas e diminuição da secreção de insulina (CHANG; GURLEY, 2012).

2.7.2 Outros modelos de diabetes

O diabetes também pode ser induzido experimentalmente por:

- a) Lesão no núcleo ventromedial do hipotálamo: causa hiperfagia, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e RI (KENNEDY et al., 1963).
- b) Utilização de hormônios anti-insulínicos (ex: epinefrina e glucagon): estimulam a glicogenólise hepática e inibem a glicogênio-sintetase, promovendo hiperglicemia (FRANKEL et al., 1984).
- c) Exposição a vírus (ex: picornavírus e vírus da encefalomiocardite): causam alterações pancreáticas e diabetes moderado e transitório (REID, 1981).
- d) Administração de hidrocortisona: causa hiperglicemia e hiperplasia das células β pancreáticas (FRANKEL et al., 1984).

- e) Alterações nutricionais e dietéticas através da utilização de dietas industriais ou artesanais com diferentes concentrações de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais, como: as dietas hipercalóricas, hiperlipídicas e hiperssódicas (HEARD; TURNER, 1967; EL AOUI et al., 2007). Tem-se como exemplo o Rato Cohen: modelo de DM 2 não obeso induzido por dieta (ORNOY et al., 2009).
- f) Pancreatectomia parcial: remoção cirúrgica de 95% do tecido pancreático, com consequente redução das células β pancreáticas. Este modelo apresenta algumas limitações como: complicados procedimentos técnicos e pós-operatórios, exigindo portanto competência necessária para a cirurgia; altas taxas de mortalidade pós-operatória (aproximadamente 20%); redução inespecífica da massa de células β e α ocasionando alterações digestórias no animal e longo período de tempo (2 a 3 meses) após a cirurgia para aparecimento dos sintomas do diabetes (FOGLIA et al., 1967; JAWERBAUM; WHITE, 2010).
- g) Agentes químicos citotóxicos (ex: aloxano e estreptozotocina): destroem seletivamente as células β do pâncreas, levando à deficiência de insulina e hiperglicemia (DICKINSON et al., 1991; SZKUDELSKI, 2001). Induzem um processo inflamatório semelhante ao que ocorre na destruição auto-imune das células β pancreáticas em humanos (KOLB, 1987). Contudo, os componentes genéticos e imunológicos da doença diabética não estão presentes nesse modelo (JAWERBAUM; WHITE, 2010). Embora, o aloxano também seja utilizado para o entendimento dos mecanismos de apoptose de célula beta, mediado por ROS em DM1 e DM2, este agente apresenta alta mortalidade após indução e cetose (LENZEN, 2008). Por outro lado, a estreptozotocina possui maior estabilidade e seletividade, sendo o principal agente de escolha para a indução de um estado metabólico diabético em animais.

2.7.3 Estreptozotocina e a indução do diabetes experimental

2.7.3.1 Estrutura química e mecanismos de ação

A estreptozotocina (STZ) foi descoberta em 1959, isolada a partir de bactérias do solo gram-positivas (*Streptomyces achromogenes*) (LEWIS; BARBIERS, 1959). É análoga da glicose (Glu) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc) com fórmula molecular de $C_8H_{15}N_3O_7$ e peso molecular de 265 g/mol (DOLAN, 1997). Sua estrutura é composta por uma porção

nitrosuréia com grupo metil ligado a uma extremidade e uma molécula de glicose na outra extremidade [2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosureia)-1-D-glicopirranose] (DOLAN, 1997). Após sua descoberta, foi utilizada como um antibacteriano de largo espectro e antineoplásico no tratamento de metástase pancreática (LEWIS; BARBIERS, 1959). Em 1963, Rakieten e colaboradores, reportaram sua atividade diabetogênica e a partir desse momento passou a ser utilizada para indução de diabetes experimental (RERUP, 1970) por promover toxicidade seletiva das células β pancreáticas, devido a presença da molécula de glicose na sua estrutura química, o que permite que ela seja absorvida através do transportador de glicose GLUT 2 (ELSNER et al., 2007). Assim, as células β pancreáticas são mais sensíveis a STZ, enquanto que as células que não expressam o GLUT2 são resistentes (ELSNER et al., 2007). O parênquima extra pancreático permanece intacto após a administração de STZ, confirmando sua seletividade pelas células β pancreáticas (LENZEN, 2008).

Evidenciou-se que, em comparação a outros tipos celulares, as células β pancreáticas, especialmente as de roedores, são particularmente mais sensíveis à ação diabetogênica da STZ, o que é conferido pela baixa expressão gênica das enzimas antioxidantes e devido ao seu baixo nível de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (KANETO et al., 2002). Entretanto, a STZ não afeta as células β do pâncreas de seres humanos. Esta resistência é atribuída ao baixo nível de expressão do transportador GLUT 2 na célula β humana (FERRER; BENITO; YANG; WRIGHT, 2002; KOEHN et al., 2008). É importante destacar, que outras células que expressam o tal como os hepatócitos e as células tubulares renais são também suscetíveis aos danos causados pela STZ. Isso explica porque os modelos experimentais, induzidos com STZ, desenvolvem modificações renais e hepáticas (RERUP, 1970; ELEAZU; IROAGANACHI, ELEAZU, 2013a). Nos enterócitos intestinais, onde o transporte de glicose é semelhante ao rim, o diabetes induzido por STZ aumenta os níveis de GLUT1 (BOYER et al., 1996), GLUT2 e GLUT5 (CORPE et al., 1996).

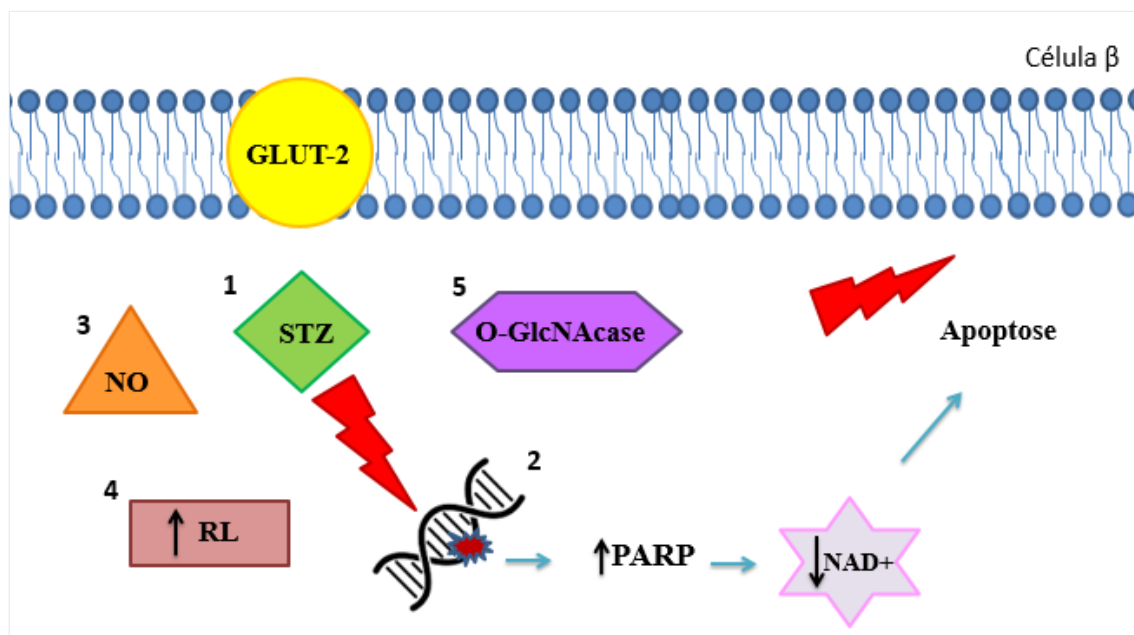
Vários mecanismos são propostos para explicar a ação diabetogênica da STZ sobre as células β pancreáticas (Figura 1) (ELEAZU; IROAGANACHI, ELEAZU, 2013a), dentre eles:

1. *A metilação do DNA*: O grupo N-metil-N-nitrosouréia na posição O6 da guanina levaria a danos no DNA com necrose das células β pancreáticas, através da depleção de reservas de energia. Em resposta, ocorre a ativação de uma enzima reparadora do DNA, a poli-ADP-ribose-polimerase (PARP), que utiliza como substrato a forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). A elevação da atividade

desta enzima provoca a depleção de NAD⁺ intracelular, levando à inibição da respiração celular, da produção de ATP, da síntese proteica e consequentemente da biossíntese e secreção da insulina (EVELSON et al., 2005; SILVA et al., 2011). A administração de inibidores da poli ADP ribose polimerase, como a nicotinamida antes da indução de STZ em modelos experimentais, protege as células β pancreáticas das ações tóxicas de STZ, bem como impede o desenvolvimento do diabetes (STAUFFACHER et al., 1970).

2. *Produção de óxido nítrico*: As células β pancreáticas são particularmente sensíveis aos danos por óxido nítrico e radicais livres devido aos seus baixos níveis de enzimas antioxidantes (SPINAS, 1999). A STZ tem capacidade para agir como doadora de óxido nítrico em células pancreáticas o que leva a alquilação e danos ao DNA. Ela também pode aumentar a atividade de guanilato-ciclase e a formação de GMPC (FRIEDERICH; HANSELL; PALM, 2009).
3. *Geração de radicais livres*: a administração da STZ causa aumento do malondialdeído, superóxido e radicais hidroxila. O processo da destruição da célula β é acelerado pelo fato deste tipo de célula não possuir enzimas antioxidantes como a catalase e glutathione peroxidase (VERGANI et al., 2004).
4. *Glicosilação de proteínas*: a STZ poderia aumentar a glicosilação proteica nas ilhotas pancreáticas pela inibição seletiva da O- β -D-N-acetilglicosaminidase (O-GlcNAcase), enzima que hidrolisa ligações glicosídicas. Isto causaria O-glicosilação irreversível das proteínas intracelulares levando a apoptose das células β pancreáticas (KONRAD et al., 2001; KRENTZ, 2003).

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de ação da estreptozotocina (STZ).



1) A STZ é absorvida pela célula β pelo transportador de glicose (GLUT2). 2) Metilação do DNA pela STZ, com ativação da poli-ADP-ribose polimerase (PARP), levando ao esgotamento de NAD^+ e das reservas de ATP que causam a apoptose das células β pancreáticas. 3) Liberação espontânea de óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) pela STZ, comprometimento das mitocôndrias, com inibição da síntese de ATP, levando a morte das células β . 4) Geração de radicais livres (RL) causando danos as células β . 5) Inibição da O- β -D-N-acetilglicosaminidase (O-GlcNAcase) pela STZ, com formação de proteínas glicosiladas irreversíveis que danificam células β pancreáticas.
Fonte: A autora (2017).

2.7.3.2 Administração da estreptozotocina

O tempo de meia vida da STZ é de 5 a 15 minutos (SCHEIN; LOFTUS, 1968; ELEAZU et al., 2013b) e a dose necessária para a indução de diabetes depende da espécie animal, idade, via de administração, peso e estado nutricional (ETUK; MOHAMMED, 2010). Com o objetivo de reproduzir efeitos metabólicos maternos e fetais semelhantes ao diabetes pré-gestacional e ao DG, utiliza-se a administração pela via endovenosa (e.v.) e intraperitoneal (i.p.) (DELFINO et al., 2002), variando-se as doses e o tempo de administração. Esta pode ser realizada no período neonatal (KAYA-DAGISTANLI; OZTURK, 2013), antes do acasalamento (LÓPEZ-SOLDADO; HERRERA, 2003) ou durante a prenhez (PORTO et al., 2010; RAMOS-ALVES et al., 2012,b). Embora, a STZ seja mais comumente administrada via e.v. e i.p., outras vias, como a subcutânea, intracardíaca e intramuscular também são utilizadas em roedores (McNEILL, 1999). Todavia, a via i.p. é

considerada um método rápido e de fácil administração, especialmente para estudos que envolvem múltiplas doses (DEEDS et al., 2011). A punção acidental do intestino, bexiga ou vasos ou administração subcutânea pode resultar em uma diminuição do efeito diabetogênico. Alguns autores sugerem que a administração e.v. da STZ produz um modelo mais estável e reprodutível de diabetes do que a administração i.p., entretanto as maiores dificuldades da indução por esta via estão relacionadas com o número e tamanho limitado de veias periféricas e o adequado manejo da dor e estresse do animal, os quais adicionam novas variáveis ao experimento (DONOVAN; BROWN, 2005). Outro fator que pode alterar a indução do diabetes em animais é o horário em que a STZ é administrada, segundo Candela, Hernandez e Gagliardino (1979) a maior incidência de diabetes ocorre quando a STZ é administrada às 16 horas e a menor em animais injetados às 8 horas.

Em relação ao seu preparo e para melhores resultados em animais, é sugerido que a STZ seja administrada em jejum e recém-preparada (dentro de 10 minutos), dissolvida em tampão citrato (pH 4,4-4,5) (ELEAZU; IROAGANACHI, ELEAZU, 2013a). Contudo, Axler (1982) demonstrou que para a reconstituição da STZ o pH 7,2 é comparável ao pH 4,5.

Há uma resposta trifásica da glicose plasmática após administração de STZ. Primeiramente ocorre hiperglicemia transitória devido à súbita quebra do glicogênio hepático, seguida de hipoglicemia, que se inicia em cerca de 6 horas, podendo levar a morte. Posteriormente, ocorre hiperglicemia permanente, que se inicia entre 10 a 12 horas após a administração STZ. Alterações estruturais em células β pancreáticas (desgranulação total) ocorrem dentro de 48 h após a administração de STZ e podem durar até quatro meses (JUNOD et al., 1967; LEE et al., 2010). A sensibilidade a STZ, depende do gênero dos roedores, camundongos e ratos machos tendem a ser mais suscetíveis ao diabetes induzido por esse agente e apresentam uma hiperglicemia mais severa (NAKAMURA et al., 1984; LEITER, 1982; CORTRIGHT et al., 1996; SZKUDELSKI, 2001), mesmo em doses idênticas, em comparação as fêmeas. Essa diferença é atribuída à capacidade do estradiol em proteger as células β pancreáticas da apoptose induzida por STZ (LE MAY et al., 2006).

Uma preocupação de estudos que utilizam STZ durante a prenhez é a possibilidade de que a toxina atravessasse a placenta e atue no pâncreas e outros tecidos fetais, o que dificultaria a análise de efeitos da hiperglicemia intrauterina, em longo prazo (RYAN et al., 1995). Nesse contexto, é importante salientar que o desenvolvimento das células β pancreáticas em ratos ocorre principalmente durante a última semana de crescimento fetal (BLONDEAU; BREANT, 2005). Portanto, a indução do diabetes nas primeiras semanas de gestação, não afetaria o pâncreas fetal. Blondeau e colaboradores (2011), mostraram que o pâncreas da

prole de ratas da linhagem Sprague Dawley, submetidas a 35 mg/kg de STZ no dia 0 de gestação, apresentava-se histologicamente normal, sugerindo que a STZ não altera a massa de células β pancreáticas. É importante destacar que, a administração de STZ antes da prenhez afeta a fertilidade e prejudica o desenvolvimento do embrião durante o período de pré-implantação (VERCHEVAL et al., 1990). No entanto, quando essa administração é realizada a partir do 5º dia de gestação (YESSOUFOU et al., 2006) não tem efeito sobre o desenvolvimento do embrião (LOPEZ-SOLDADO; HERRERA, 2003).

2.7.3.3 Doses diabetogênicas da estreptozotocina

Junod e colaboradores (1969), estabeleceram a atividade diabetogênica da STZ para a linhagem de ratos Wistar, demonstrando que o diabetes pode ser induzido nas doses de 25 a 100 mg/kg e que a gravidade do distúrbio metabólico é proporcional à dose utilizada. Todavia, Wu e Huan (2008) demonstraram que a STZ pode ser administrada em uma única dose variando de 100 a 200mg/kg por via i.p., e que a taxa de mortalidade pode ser superior a 20% na primeira semana após a indução. Dependendo da espécie animal, sexo, idade, estado nutricional, dose, via de administração do fármaco, e o período de vida em que é administrada em animais, a STZ pode induzir, em ratos, diabetes severa (glicose superior a 200/300 mg/dL) (ERIKSSON; CEDERBERG; WENTZEL, 2003; DAMASCENO et al., 2004; RUDGE et al., 2007; VOLPATO et al., 2008; De SOUZA et al., 2010) ou diabetes leve a moderada (glicemia entre 120 e 200/300 mg /dL) (PORTHA et al., 1974; TSUJI et al., 1988; MERZOUK et al., 2000; DAMASCENO et al., 2011). O tipo de diabetes induzida por STZ é controverso, visto que os efeitos causados pela STZ podem ser semelhantes a qualquer um dos tipos de DM 1 ou 2 (ARÍAS-DÍAZ; BALIBREA, 2007; BOROUJENI et al., 2011). Alguns autores consideram que o diabetes induzido por STZ pertencente à categoria de “outros tipos específicos” ou “diabetes induzido quimicamente”. No entanto, outros investigadores concluíram que a STZ produz DM 1 (BOROUJENI et al., 2011). As comparações entre estudos sobre o diabetes induzido pela STZ em ratos são complexas, devido à ampla variação entre as doses empregadas e os níveis de hiperglicemia alcançados.

Caluwaerts e colaboradores (2003) observaram que, os valores de glicemia normais encontram-se abaixo de 100 mg/dL. Para esses autores, a hiperglicemia moderada varia de 120 a 300 mg/dL e a hiperglicemia severa acima de 300 mg/dL. Estudos realizados por Sinzato e colaboradores (2009) demonstraram que, modelos experimentais que apresentem

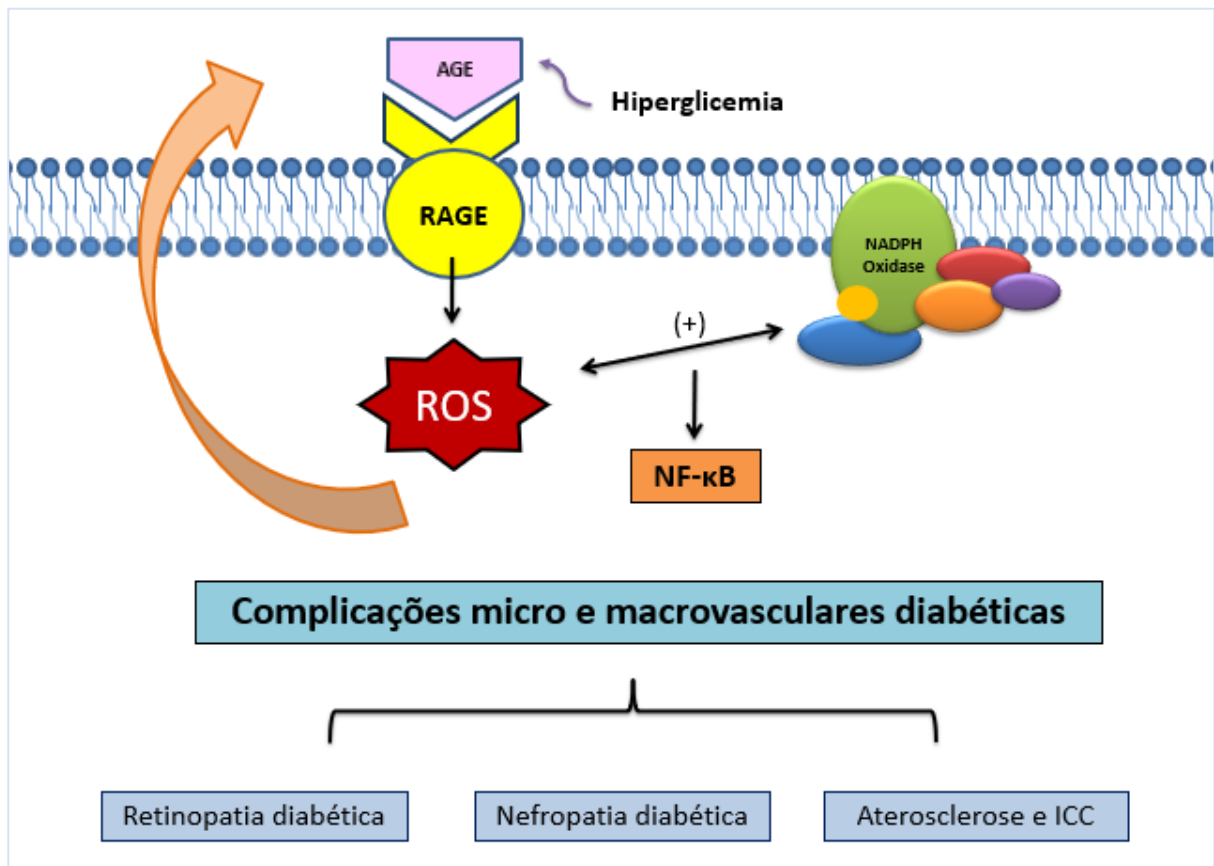
glicemia em jejum maiores do que 200 ou 360 mg /dL, reproduzem diabetes grave do tipo 1, enquanto que animais com diabetes experimental leve (glicemia em jejum entre 120 e 360 mg / dL) caracteriza estado clínico do DM2. Alguns autores observaram que animais submetidos ao DG induzido por STZ, na dose de 35 mg/kg, apresentaram níveis de glicose inferiores a 200 mg/dL ou superiores a 400 mg/dL (LOPEZ-SOLDADO et al., 2003). Evidências sugerem que um ambiente levemente hiperglicêmico está associado a fetos macrossômicos e hipoinsulinêmicos (AERTS; ASSCHE, 1979; MERZOUK et al., 2000), enquanto que mães severamente diabéticas podem gerar fetos com baixo peso corporal e malformados (HOLEMANS et al., 1991). Outros estudos também demonstraram vias e doses ideais para indução do diabetes em várias espécies: como ratos (50 a 75 mg /kg, ip (PUSHPARAJ; TAN; TAN et al., 2000; ELEAZU; IROAGANACHI, ELEAZU, 2013a) camundongos (175 a 200 mg /kg i.p ou iv (SHARMA et al., 2010) e cães (15 mg /kg durante 3 dias) (SHARMA et al., 2010). Em doses mais baixas, o diabetes induzido por STZ não é estável, uma vez que pode ocorrer a recuperação espontânea ao estado normoglicêmico (ELEAZU; IROAGANACHI, ELEAZU, 2013a).

A STZ ocasiona alterações e distúrbios hidroeletrólítico e da homeostase, semelhantes aos observados em humanos, como perda de massa corporal, hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria e polifagia que refletem a anormalidade no funcionamento das células β pancreáticas (KEELY et al., 2008). Várias complicações crônicas micro e macrovasculares como a neuropatia, nefropatia e cardiopatia diabética, também estão presentes no diabetes experimental (JUNOD et al., 1967; HAKIM; PATEL; GOYAL, 1997; SCHAAN et al., 2001; De ANGELIS et al., 2002). Além de redução na atividade física diária e da temperatura corporal (HOWARTH et al., 2006), alteração de reflexos cardiovasculares e variabilidade da frequência cardíaca (SCHAAN et al., 2004; De ANGELIS et al., 2009). Outros estudos também demonstraram que ratas com diabetes induzido por STZ, apresentaram diferentes repercussões placentárias em função do nível glicêmico, além de alterações no fluxo uterino-placentário e nas trocas materno-fetais (CALDERON et al., 1999; DAMASCENO, 2002; VAMBERGUE; FAJARDY, 2011).

2.8 MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DO DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES

A exposição prolongada a hiperglicemia resulta na interação entre várias vias moleculares responsáveis pela fisiopatologia das complicações cardiovasculares diabéticas. Desse modo, a hiperglicemia crônica promove o aumento da formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) e sua ligação com o receptor RAGE. A interação AGEs-RAGE ativa a NADPH oxidase, que induz o aumento da formação de ROS, levando ao estresse oxidativo, com consequente ativação do NF- κ B, um fator de transcrição relacionado com a regulação de vários genes pró-inflamatórios, fatores de crescimento, moléculas de adesão, além do próprio RAGE, em um *feedback* positivo (Figura 2) (BAEUERLE, 1991; MOHAMED et al., 1999; BROWNLEE, 2005; HAMDEN et al., 2009; GIACCO; BROWNLEE, 2010; INZUCCHI; SHERWIN, 2010).

Figura 2 – Relação entre a hiperglicemia crônica e o desenvolvimento das complicações diabéticas.



A hiperglicemia leva ao aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) que se ligam ao seu receptor (RAGE). Uma das consequências da interação AGEs-RAGE é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam ao estresse oxidativo, através da ativação da NADPH oxidase com consequente ativação de fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB). A ativação do NF-κB, culmina em um feedback positivo sobre a síntese de ROS e do próprio RAGE, potencializando a disfunção vascular e alterando a expressão gênica.

Fonte: A autora (2017).

2.8.1 O estresse oxidativo

A oxidação consiste de um processo metabólico para a produção de energia necessária as atividades celulares. Nos sistemas biológicos ocorre pela ação dos radicais livres (MITTLER, 2002). Estes são definidos como qualquer átomo ou molécula, que possui um ou mais elétrons desemparelhados, em sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNER, 2001; LIEN et al., 2008). Esta configuração química as torna altamente instáveis, com um tempo de meia-vida curto e quimicamente muito reativas. Os radicais livres derivados do metabolismo do oxigênio são denominados de

espécies reativas de oxigênio (ROS) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LOBO et al., 2010; LUSHCHAK, 2015).

As ROS podem estar envolvidas em funções celulares importantes, como no controle da pressão sanguínea e da respiração celular, na sinalização celular, na contração muscular, na apoptose, na diferenciação e desenvolvimento celular, na aderência de leucócitos a células endoteliais, ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra agentes patogênicos (DROGE, 2002; DAVALLI et al., 2016). Contudo, quando a produção e liberação das ROS são alteradas por fatores ambientais ou patológicos e suas concentrações excedem a capacidade de eliminação pelos antioxidantes, verifica-se o estado de estresse oxidativo (VALKO et al., 2007; ESPINOSA-DIEZ et al., 2015; SIES, 2015; KURUTAS, 2016).

Em condições fisiológicas, as ROS são rapidamente eliminadas pelos antioxidantes como as vitaminas A, C e E, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as enzimas do ciclo da glutathiona (BAJAJ; KHAN, 2012; MATOUGH et al., 2012; KUMAWAT et al., 2013). Contudo, uma diminuição das enzimas antioxidantes é observada em pacientes diabéticos (SUNDARAM et al., 1996; ODUM; EJILEMELE; WAKWE, 2012; KUMAWAT et al., 2013).

É bem conhecido que, o estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de doenças crônicas, como as doenças autoimunes, respiratórias, cardiopatias, neoplasias, diabetes, obesidade e distúrbios neurológicos (MACNEE, 2001; ANTONIADES et al, 2003; STOCKER; KEANEY, 2004; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Muitas das alterações metabólicas presentes no diabetes são causadas pelo estresse oxidativo através do aumento de ROS, geradas principalmente durante a auto oxidação da glicose e por outras reações oxidativas com consequente glicação de proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (YOUNG, 1995; BAYNES, 1999; YAN, 2014). Além disso, a hiperglicemia leva a redução dos sistemas de defesa antioxidante em consequência da diminuição da disponibilidade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), do sistema da glutathiona, bem como pelo dano oxidativo das enzimas envolvidas (MCLENNAN et al., 1991; LAMBETH; NEISH, 2014; PRIETO-BERMEJO; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, 2017).

2.8.1.1 Espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes

Dentre as principais espécies reativas destacam-se: o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o óxido nítrico ($NO\cdot$), radical hidroxila ($OH\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\cdot-}$ é a primeira espécie gerada, através da redução da molécula de oxigênio por adição de um elétron (DRÖGE, 2002; TRACHOOTHAM et al., 2008). É produzido durante o processo inflamatório, por fagócitos, linfócitos e fibroblastos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Diversas vias metabólicas podem originar o $O_2^{\cdot-}$, como a cadeia respiratória mitocondrial quando há o escape de elétrons entre o complexo I e II (INDO et al., 2015); pela via da xantina oxidase através da conversão de hipoxantina em xantina no catabolismo das purinas para formação do ácido úrico (MURRAY et al., 1996) e pela enzima NADPH oxidase (SIES, 2015; LAMBETH; NEISH, 2014). O $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o $OH\cdot$, ou com o H_2O_2 ou com o $O_2^{\cdot-}$ produzindo oxigênio singlete (1O_2) e com o $NO\cdot$ produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$). O $O_2^{\cdot-}$ participa da produção do $OH\cdot$ através da reação de Haber-Weiss (Tabela 2). Sua atuação como oxidante direto é mínima, sendo a cisteína é o único aminoácido que sofre oxidação por este radical. O $O_2^{\cdot-}$ é eliminado pela enzima superóxido dismutase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; EL-REMESSY et al., 2013).

O $NO\cdot$ apresenta tempo de meia vida de 1 a 10 segundos. Pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase e pela estimulação de fagócitos humanos. Sua reação com o $O_2^{\cdot-}$, produz $ONOO^-$ (Tabela 2) e outros produtos capazes de causar a nitração de biomoléculas como aminoácidos com anéis aromáticos (ex: tirosina gerando nitrotirosina) e bases do DNA (ex: guanina gerando 8-nitroguanina) (GIASSON et al., 2002; HIRST; ROBSON, 2011).

O $OH\cdot$ possui um tempo de meia vida de 10^{-9} segundos. É considerado o mais reativo em sistemas biológicos. Pode desencadear a lipoperoxidação das membranas celulares, inativação de proteínas que possuem grupos sulfidrilas ($-SH$) e mutações no DNA. É formado através da reação do H_2O_2 com íons metálicos, pela Reação de Fenton. A reação de Haber-Weiss representa outra via de produção do $OH\cdot$. Nesta via o H_2O_2 reage com o $O_2^{\cdot-}$, na presença de metais de transição, levando a formação do $OH\cdot$ (Tabela 2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; LIPINSKI, 2011).

O H_2O_2 é formado pela redução do oxigênio molecular por adição de dois elétrons, entretanto por não possuir elétrons desemparelhados em sua última camada, não é considerado um radical livre. Pode ser gerado pela superóxido dismutase, através da

dismutação do $O_2^{\bullet-}$ ou pela β -oxidação de ácidos graxos. O H_2O_2 possui maior estabilidade e tempo de meia vida comparado ao $OH^{\bullet}$, sendo capaz de permear as camadas lipídicas e oxidar proteínas ligadas ao Fe^{2+} , resíduos de metionina ou grupos tiol. A decomposição do H_2O_2 catalisada por metais de transição, como Cu^{2+} e Fe^{2+} , produzem o $OH^{\bullet}$, pela reação de Fenton (Tabela 2) (HANCOK; DESIKAM; NEIL, 2001; STONE; YANG, 2006; POWERS et al., 2011). O H_2O_2 é reduzido pela catalase e pela glutathione peroxidase (GPx) (BIRDEN et al., 2012).

Tabela 2 - Principais espécies reativas.

Espécies Reativas	Fórmulas	Equações
Radical superóxido	$O_2^{\bullet-}$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ $Hipoxantina + 2O_2 \rightarrow Xantina + 2O_2^{\bullet-}$ $Xantina + 2O_2 \rightarrow \text{Ácido úrico} + 2O_2^{\bullet-}$ $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + 2O_2^{\bullet-} + H^+$ $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$ (reação de Haber-Weiss)
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	$O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ $Hipoxantina + H_2O + O_2 \rightarrow Xantina + H_2O_2$ $Xantina + H_2O + O_2 \rightarrow \text{Ácido úrico} + H_2O_2$
Radical Hidroxila	$OH^{\bullet}$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$ (reação de Fenton) $O_2^{\bullet-} + OH^{\bullet} \rightarrow {}^1O_2 + OH^-$
Oxigênio singlete	1O_2	$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow OH^- + OH^{\bullet} + {}^1O_2$ $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$
Peroxinitrito	$ONOO^-$	$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$

Fonte: adaptado de BIRBEN et al., 2012.

As principais enzimas antioxidantes responsáveis por manter a concentração de ROS em níveis fisiológicos são: a SOD, a CAT e o sistema da glutathiona (Tabela 3 e Figura 3) (GINTER; SIMKO; PANAKOVA, 2014).

Tabela 3 - Principais antioxidantes.

Antioxidantes	Sigla	Equações
Catalase	CAT	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
Superóxido Dismutase	SOD	$\text{Metal}^{(n+1)} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Metal}^n + \text{O}_2$
		$\text{Metal}^n + \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Metal}^{(n+1)} + \text{H}_2\text{O}_2$
Glutathiona Peroxidase	GPx	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$
Glutathiona Redutase	GR	$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$

Fonte: BIRBEN et al., 2012.

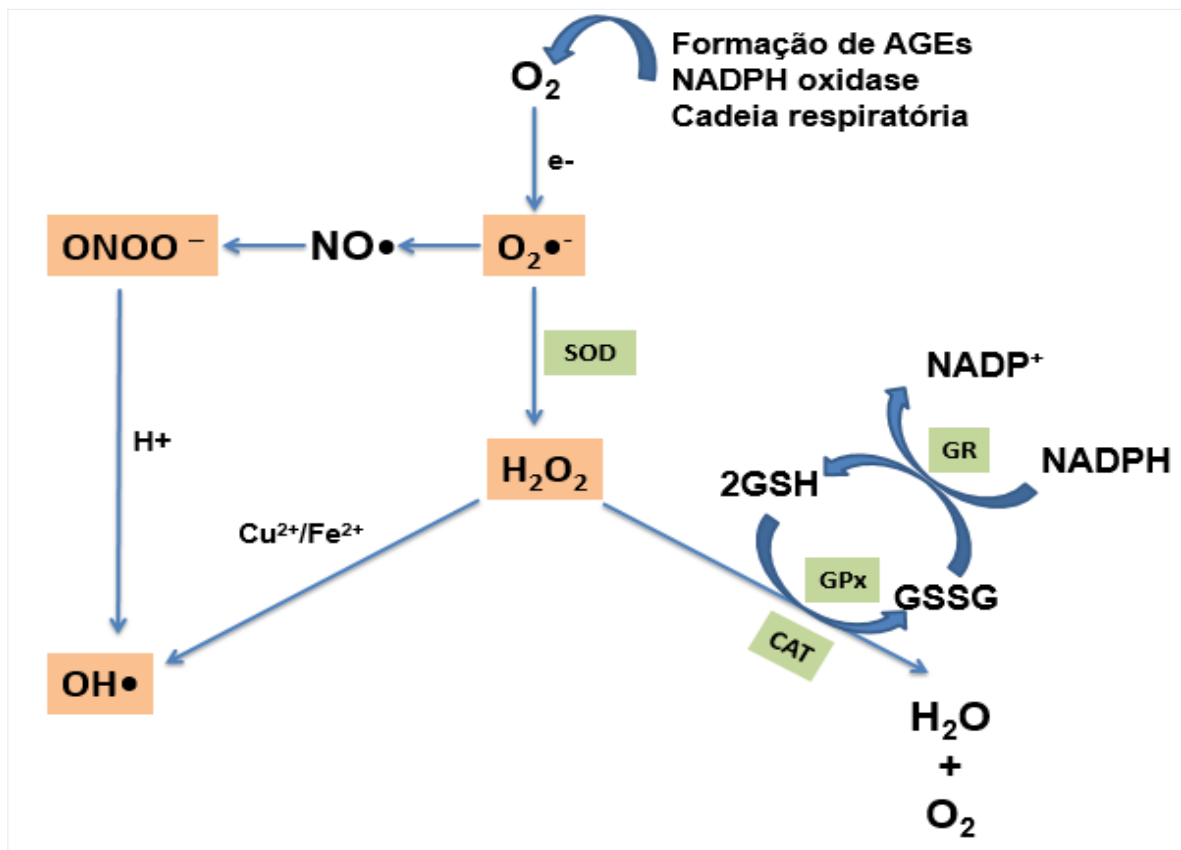
A SOD é uma glicoproteína tetramérica, descoberta em 1969 (McCORD; FRIDOVICH, 1969) que catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ , e também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de Fe^{+++} (Tabela 3) (TRACHOOTHAM et al., 2008; POWERS et al., 2010). Em humanos, são descritas três isoformas da SOD a SOD 1, SOD 2 e SOD 3. A Cu, Zn-SOD ou SOD 1, é encontrada nos peroxissomos do citosol e no espaço intermembrana mitocondrial, ela contém Cu^{2+} - Zn^{2+} como centros redox, cuja atividade não está relacionada com o estresse oxidativo. A Mn-SOD ou SOD 2, contém o manganês como centro ativo, sendo localizada na matriz mitocondrial e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. A EC-SOD ou SOD 3, também contém Cu^{2+} - Zn^{2+} como centro ativo, sendo encontrada na matriz extracelular, especialmente em áreas com alta quantidade de fibras de colágeno do tipo I e ao redor de vasos pulmonares e sistêmicos (ACHANTA; HILEMAN; HUANG, 2001; ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; KINNULA; CRAPO, 2003; BIRDEN et al., 2012).

A CAT é um tetrâmero composto por quatro monômeros idênticos, cada um contendo um grupo heme como centro ativo. É localizada nos peroxissomos do citosol e catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Tabela 3). Sua atividade é dependente da concentração de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A NADPH intracelular mantém a catalase na forma ativa e é gerada pela redução da NADP1 através da glicose-6-fosfato desidrogenase, a partir da via metabólica das pentoses-fosfato, durante a conversão de glucose 6-fosfato em 6-fosfogluconolactona (BIRDEN et al., 2012).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo citoplasmático constituído por glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo sulfidríla (-SH) - grupo tiol da cisteína - responsável pelas suas propriedades bioquímicas de proteção contra ROS (ESPINOSA-DIEZ et al., 2015). É considerada o antioxidante/ tiol mais abundante do meio intracelular, protege a célula de lesões resultantes da exposição a agentes como íons ferro, radiação e luz ultravioleta. Também pode atuar no transporte, bem como reservatório da cisteína, na detoxificação de agentes químicos e na eliminação de produtos da lipoperoxidação, ou ainda, ser requerida para a síntese de DNA, de proteínas e prostaglandinas. Converte a vitamina C e E para suas formas ativas e protege as células contra a apoptose, interagindo com vias de sinalização pró-apoptótica e anti-apoptótica. Também regula e ativa vários fatores de transcrição, tais como AP-1 (ativador de proteína 1), NF- κ B e Sp-1 (proteína de especificidade 1) (MASELLA et al., 2005; POMPELLA; CORTI, 2015). A relação GSH / GSSG é um importante determinante do estresse oxidativo, enquanto a NADPH e a glicose-6-fosfato desidrogenase é um crítico determinante desta relação. Portanto, sendo consideradas elementos essenciais na regulação das enzimas do ciclo metabólico da glutathiona (TRACHOOTHAM et al., 2008; POWERS et al., 2011).

O ciclo redox deste peptídeo é conhecido como “ciclo da GSH”, que é composto pela atividade de três enzimas: glutathiona oxidase, GPx e glutathiona redutase (GR). Juntas elas atuam na proteção antioxidante contra o H_2O_2 , produto da reação catalisada pela SOD (Tabela 3) (BIRDEN et al., 2012). A GPx descrita inicialmente por Mills em 1957 e identificada em 1978 como uma selenocisteína, reduz H_2O_2 ou peróxidos orgânicos (ROOH) para H_2O ou álcool (ROH), respectivamente. A GSH doa H^+ e é oxidada a glutathiona dissulfeto (GSSG) pela GPx (TRACHOOTHAM et al., 2008; POWERS et al., 2011). A GR é uma flavoproteína, responsável pela regeneração da glutathiona, a partir da redução da GSSG à sua forma reduzida (GSH), utilizando FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e NADPH como doador de elétrons (Figura 3). Desse modo, condições que levem a diminuição do fornecimento de NADPH, como por exemplo, durante o jejum e na deficiência da glicose-6-fosfato podem levar a um prejuízo da função da GR. Habitualmente a reserva intracelular de GR é alta, somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A CAT e a SOD agem principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto o sistema GPx protege regiões hidrofóbicas, como os peróxidos lipídicos (MICHIELS et al., 1994).

Figura 3 – Representação esquemática das espécies reativas e dos antioxidantes.



As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão destacadas em laranja. O oxigênio é convertido em radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela ativação de vias enzimáticas e não-enzimáticas. Por meio de um processo denominado dismutação, o $O_2^{\bullet-}$, ao receber íons hidrogênio, gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tal reação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pela catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx) ou em radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) através da reação com Cu^{2+} ou Fe^{2+} . A glutathione redutase (GR) regenera a glutathione reduzida (GSH) a partir da redução da glutathione oxidada (GSSG), utilizando NADPH como doador de elétrons. O $O_2^{\bullet-}$ também pode reagir com o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$).

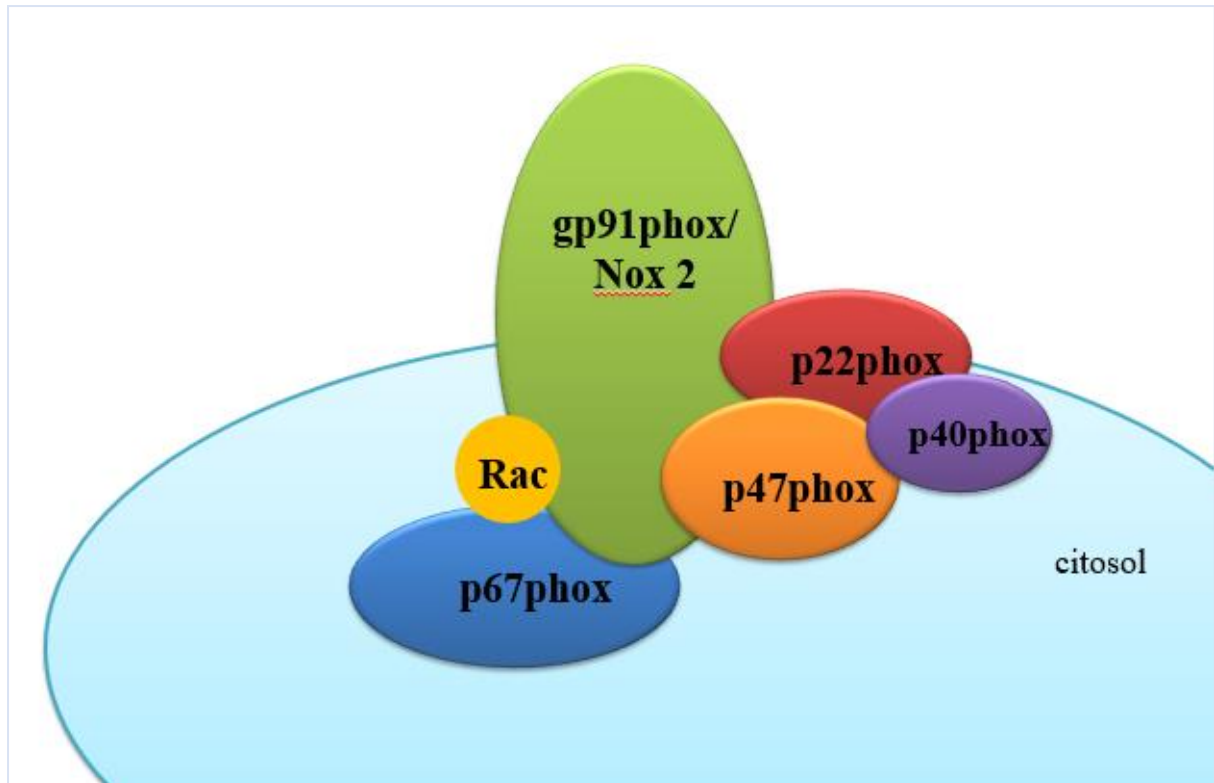
Fonte: A autora (2017).

2.8.2 A NADPH oxidase: estrutura e isoformas

A NADPH oxidase é uma das principais enzimas geradoras de ROS. Esta enzima catalisa a produção de $O_2^{\bullet-}$ pela redução de um elétron utilizando o NADH ou NADPH como doador de elétrons. A NADPH oxidase fagocítica é predominantemente expressa em fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e outras células (eosinófilos e linfócitos B) e sua atividade está relacionada com a defesa contra microrganismos (CACHAT et al., 2015). É composta por cinco subunidades presentes na membrana celular e no citoplasma além de uma proteína G regulatória (Rac 2). O componente associado à membrana, o citocromo b558-oxidase, é formado por uma subunidade maior, a gp91phox/ Nox2, e uma menor conhecida como

p22phox. Ainda, existem outras três subunidades citoplasmáticas: a p47phox, p67phox e a p40phox (Figura 4). A ativação da NADPH oxidase é iniciada com a fosforilação em serina da subunidade p47phox, promovendo sua migração para a membrana, onde juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (RABELO et al., 2010; GRAY; JANDELEIT-DAHLM, 2014).

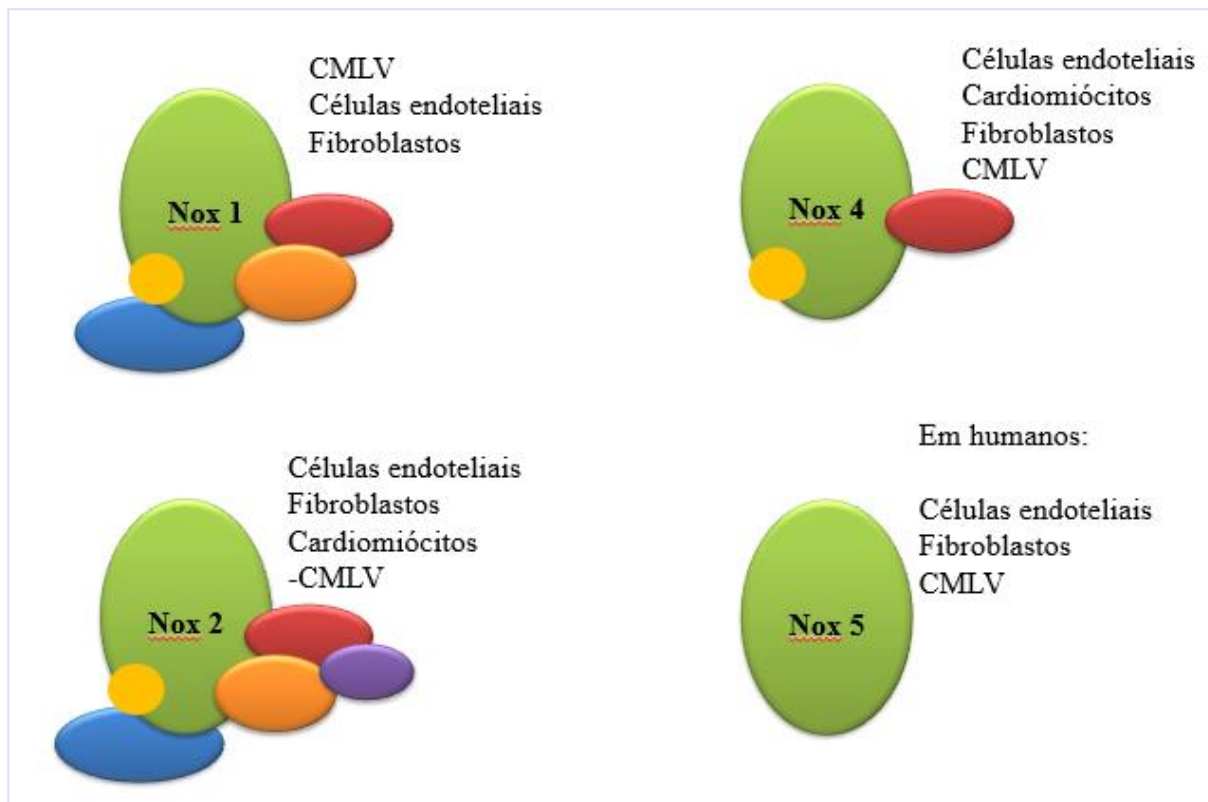
Figura 4 – Representação das subunidades da NADPH oxidase.



Fonte: A autora (2017).

Por muito tempo, acreditava-se que a geração de $O_2^{\bullet-}$ ocorria apenas em fagócitos. Contudo, foram identificadas várias enzimas em diferentes tecidos, responsáveis pela produção de ROS. Nos últimos anos outras NADPH oxidases surgiram como uma das principais fontes de ROS na vasculatura. Subtipos da NADPH oxidase foram analisados estruturalmente e funcionalmente, bem como a relação da NADPH oxidase nas vias de sinalização, função celular e doença vascular (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010). Estas enzimas são semelhantes a NADPH fagocítica e são conhecidas como a família Nox ("Nonphagocytic NADPH Oxidase"). Esta família é composta por sete membros: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 (PARAVICINI, 2002). Mas 4 (Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5) são expressas no sistema cardiovascular (Figura 5) (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010).

Figura 5 – Representação da localização das enzimas Nox.



CMLV: células musculares lisas vasculares.

Fonte: A autora (2017).

O gene da Nox5 está ausente em modelos de roedores experimentais (SEDEEK et al., 2012). A Nox1 é expressa no endotélio, músculo liso, adventícia (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; CSANYI; TAYLOR; PAGANO, 2009), na membrana plasmática (ZHANG et al., 2010) e endossomos (MILLER et al., 2007). A Nox1 ativa é encontrada em vasos de animais diabéticos (WENDT et al., 2005; SAN MARTIN et al, 2007). Ela possui 56% de homologia com a gp91phox e, associada com a p22phox, é o provável componente funcional do citocromo b558 nas células musculares lisas (LASSÈGUE et al., 2001). A expressão de Nox1 é menor no endotélio comparada a Nox2 e Nox4 que são as isoformas predominantemente expressas em cardiomiócitos e nas células endoteliais, contribuindo de maneira semelhante na produção de espécies reativas (PETRY et al., 2006).

A Nox2, formalmente conhecida como gp91phox, foi a primeira a ser identificada, é encontrada nas células endoteliais, na adventícia, em cardiomiócitos e fibroblastos, exceto nas células musculares lisas das artérias de grande calibre (CHAMSEDDINE; MILLER, 2003; LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; PETRY et al., 2006). Ela também pode alterar a função vascular e a pressão arterial (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2010). Estudos mostram que a

expressão de Nox2, está inversamente correlacionada com o relaxamento dependente do endotélio em aortas isoladas (ZEMSE; HILGERS; WEBB, 2006; TAKENOUCI et al., 2009).

A Nox4 é altamente expressa no rim (STREETER et al., 2013) e está presente em células endoteliais, células do músculo liso e em cardiomiócitos (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; AGO et al., 2004; MILLER et al., 2005; CLEMPUS et al., 2007; HAURANI et al., 2008). É a isoforma mais expressa na vasculatura (CHEN et al., 2012) e no coração, ela é quase idêntica em tamanho e estrutura a gp91phox/ Nox2 (39%) (GORIN et al., 2005). Inicialmente foi denominada oxidase renal (Renox). A Nox4 libera H_2O_2 em contraste com Nox1, Nox3 e Nox5, que liberam $O_2^{\bullet-}$ (SCHRÖDER et al., 2012). Nisimoto e colaboradores (2014) descobriram que, aproximadamente, 90% do fluxo de elétrons através da Nox 4 produz H_2O_2 e apenas 10% $O_2^{\bullet-}$.

É importante ressaltar que o aumento da expressão da Nox4 na presença do $NO^{\bullet}$ não conduz a formação do ONOO- (REY et al., 2001; TAKAC et al., 2011). Assim, o conceito de desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), importante mecanismo subjacente a disfunção vascular, o qual tem sido bem estabelecido para as fontes de $O_2^{\bullet-}$ como a Nox1 e Nox2, não se aplica a Nox4 (LANDMESSER et al., 2003). Além disso, baixas concentrações de H_2O_2 podem ter efeitos positivos no sistema vascular. O H_2O_2 não só é um vasodilatador por ativar a proteína cinase G- $I\alpha_3$ mas também pode ativar e induzir eNOS por vários mecanismos (CAI, 2005).

É relatado na literatura que o papel vascular da Nox4 ainda não está claro (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2010; GUO; CHEN, 2015) é possível que esteja envolvida tanto na lesão vascular quanto na sua proteção, assim como na redução e elevação da pressão arterial (KURODA et al., 2010; TONG et al., 2009; ZHANG et al., 2010; SCHRÖDER et al., 2012). Algumas evidências indicam o seu possível envolvimento nas complicações associadas ao DM, incluindo nefropatia, lesão cardíaca, acidente vascular cerebral e aterosclerose, bem como na RI (SEDEEK et al., 2010; PIWKOWSKA et al., 2011; MAALOUF et al., 2012; WU; WILLIAMS, 2012). Embora os mecanismos moleculares através dos quais a Nox4 exerça efeitos diferentes em diferentes tipos de células não sejam bem conhecidos, é possível que as ROS geradas por Nox4 afetem alvos distintos em cada tipo de célula. Por exemplo, a Nox4 estimula a apoptose em células endoteliais (BASUROY et al., 2009) e cardiomiócitos (AGO et al., 2010), enquanto induz a proliferação celular em células do músculo liso (STURROCK et al., 2006) e senescência celular em fibroblastos cardíacos (GEISZT et al., 2000; SHIOSE et al., 2001). O aumento da expressão cardíaca de Nox4 em camundongos

exacerba fenótipos cardíacos associados ao envelhecimento, como disfunção ventricular esquerda, apoptose e fibrose, acompanhados por estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (AGO et al., 2010).

Vale destacar que, embora todas as Nox tenham a mesma função em gerar ROS, os mecanismos de ativação e a distribuição intracelular variam entre as isoformas. Nox1 e Nox2 são constitutivamente associadas a p22phox, entretanto a ativação completa de Nox 1/ p22phox e Nox 2/ p22phox requer a interação com outras subunidades citosólicas, incluindo p47phox, p67phox e Rac (LETO et al., 2009; DUTTA; RITTINGER, 2010; STREETER et al., 2012). A Nox 4 é associada com a p22phox, mas constitutivamente ativa, não exigindo outras subunidades para a sua ativação (DUTTA; RITTINGER, 2010; STREETER et al., 2012). Fatores de crescimento, AGEs / hiperglicemia, Angiotensina I, agentes vasoativos e físicos como atrito e estiramento vascular regulam a atividade da NADPH oxidase vascular (LASSÉGUE; CLEMPUS, 2003; SAN MARTIN et al., 2007). Ademais, a geração de ROS via NADPH-oxidase, ativa várias vias de sinalização, incluindo o NF- κ B e o receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) (SEDEEK et al., 2012; KOULIS et al., 2015).

2.8.3 O receptor RAGE

O RAGE foi descrito pela primeira vez em 1992 por Neeper e colaboradores. É um membro da superfamília de receptores de imunoglobulina, composto de três domínios localizados no espaço extracelular, um único domínio transmembranar e um domínio citoplasmático curto, essencial para a transdução do sinal. O domínio citoplasmático de RAGE é ativamente necessário para a sinalização como visto em alguns estudos nos quais este receptor foi bloqueado (DATTILO et al., 2007; XIE et al., 2008). Os domínios extracelulares da imunoglobulina consistem em um domínio variável “V” e dois domínios constantes do tipo C (C1 e C2) (NEEPER et al., 1992). O domínio C2 é estruturalmente independente dos domínios V e C1, que juntos formam uma unidade estrutural integrada (VC1) importante para reconhecimento do ligante (DATTILO et al., 2007; XIE et al., 2008; BONGARZONE et al., 2017).

O RAGE é altamente expresso em células embrionárias (DEMLING et al., 2006). Durante o desenvolvimento, o receptor está presente em níveis elevados no sistema nervoso central (BRETT et al., 1993; HORI et al., 1995). Em animais adultos, a expressão de RAGE está reduzida em uma variedade de células, incluindo endotélio, células musculares lisas,

fagócitos mononucleares, neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, pericitos, neurônios, cardiomiócitos, hepatócitos, células de Muller e gânglio bipolar, células da retina e do rim (SCHMIDT et al., 1992; BRETT et al., 1993; D'AGATI; SCHMIDT, 2010). Uma exceção é o pulmão, em que níveis relativamente elevados da expressão de RAGE foram identificados em comparação a outros tecidos (NEEPER et al., 1992).

Nos tecidos, o aumento da expressão de RAGE está associado ao acúmulo de seus ligantes (SIMARD et al., 2015), como AGEs, a proteína de alta mobilidade do grupo B1 (HMGB1) (YAN; RAMASAMY; SCHMIDT et al., 2010), produtos da oxidação proteica (AOPP) (HORI et al., 1995; GUO et al., 2008;), soro amilóide A (SAA) (YAN et al., 2000; CAI et al., 2007), peptídeo β amilóide (YAN et al., 1996), complemento 3a (C3a), proteína de choque térmico 70 (HSP70), várias membros da família da proteína S100/ calgranulina (LECLERC et al., 2009), integrina Mac-1 (CD11b) (ORLOVA et al., 2007; FROMMHOLD et al., 2010) e fosfatidilserina (FRIGGERI et al, 2011).

A via de transdução de sinal do RAGE está associada a ativação de múltiplas vias de sinalização, como a proteína G, RhoA, Cdc42, Rac e Ras, os membros da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1 / 2), c-Jun N-terminal -quinase (JNK) e P38 ou Janus quinase transdutor / sinal e o ativador da transcrição (JAK/ STAT) e fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3 cinase / proteína quinase B (PI3K / AKT) cinases (KALEA; SCHMIDT; HUDSON et al., 2009), que atuam em conjunto com ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B que participa na regulação de mais de 150 genes relacionados com a inflamação, proliferação celular, a modulação do sistema imunitário ou a apoptose (TAGUCHI et al., 2000; HAYDEN; GHOSH, 2012; BONGARZONE et al., 2017).

2.8.3.1 A interação AGEs-RAGE

O RAGE é expresso em baixos níveis durante a homeostase, em muitos tecidos como fígado, coração, rim, cérebro e músculo esquelético, entretanto o aumento da sua expressão é observado, em condições patológicas como diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e autoimunes como a doença de Alzheimer, condições inflamatórias como artrite, síndrome respiratória aguda, asma e sepse (NEEPER et al., 1992; BRETT et al., 1993; DING; KELLER, 2005; RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2009; CHUAH et al., 2013; SORCI et al., 2013).

No diabetes, a hiperglicemia leva à formação de AGEs, derivados do processo de glicação, que envolve a ligação covalente não enzimática de grupos amina, presentes nas proteínas, lipídeos ou DNA com um carboidrato, como a glicose (SINGH et al., 2001; CHILELLI et al., 2013). Indivíduos diabéticos possuem níveis aumentados de AGEs que se acumulam lentamente no plasma e tecidos durante o envelhecimento (BROWNLEE, 1988; WILSON, 2011; FALCONE et al., 2013; PARK et al., 2014) e podem ser utilizados como biomarcadores clínicos das complicações hiperglicêmicas (RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2009; EL-MESALLAMY et al., 2011; KERKENI et al., 2013).

Os AGEs contribuem para a alteração da função endotelial e para as mudanças nas propriedades mecânicas e funcionais da parede dos vasos, através da promoção de espessamento da membrana basal, aumento da permeabilidade vascular e do estado pró-trombótico (SIMARD et al., 2015), o que resulta em danos para retina, néfrons, sistema nervoso periférico, sistema nervoso central (SNC) e aterosclerose (GRUNDY et al., 1999; YAMAGISHI, 2011). No contexto de complicações diabéticas, a ativação de RAGE por seus ligantes é fortemente associada à patologia inflamatória no rim, nervos periféricos e vasos (YAN; RAMASAMY; SHMIDT, 2012). Desse modo, nos últimos 15 anos, o RAGE tem se destacado como um receptor capaz de se ligar a diversas moléculas associadas à resposta celular e à lesão de tecidos, infecção e inflamação (GOLDIN et al., 2006; YAN; RAMASAMY; SCHMIDT, 2010; YAMAMOTO; YAMAMOTO, 2012; BONGARZONE et al., 2017).

Evidências experimentais demonstraram a interação de AGEs-RAGE nas complicações cardiovasculares. O primeiro estudo mostrando o efeito de RAGE sobre o aumento da permeabilidade vascular foi realizado em modelos de diabetes induzidos por STZ (VIBERT, 1983). Para melhor caracterizar a implicação desta interação em lesões vasculares, estudos foram realizados em camundongos diabéticos deficientes em apolipoproteína E (PARK, 1998) os quais apresentaram aterosclerose e aumento da expressão de RAGE e seus ligantes inflamatórios na aorta. O tratamento desses animais com a forma solúvel do RAGE (sRAGE), o qual compete pelo sítio de ligação do RAGE, induzindo a transdução de sinal intracelular, suprimiu completamente a aterosclerose diabética, no entanto não foram observadas alterações na glicose e nos lipídeos plasmáticos (PARK, 1998).

O bloqueio da interação AGEs-RAGE e consequentemente a supressão da ativação e sinalização do RAGE pelo tratamento com sRAGE também foram avaliados por outros autores em animais e pacientes diabéticos (GOOVA et al., 2001; BUCCIARELLI et al., 2002; KATAKAMI et al., 2007). Acredita-se que níveis elevados de sRAGE estejam associados a

um menor risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana, doença renal, hipertensão, síndrome metabólica, artrite e Alzheimer. Desse modo o sRAGE pode ser considerado, um novo alvo terapêutico promissor na prevenção de dano vascular e neurodegenerativo (KIM et al., 2012; SELVIN et al., 2013; GEROLDI; FALCONE; EMANUELE, 2006; HEIER et al., 2015).

Estudos em cultura de células mostram que a interação AGEs-RAGE medeia a ativação celular em vasos diabéticos e altera a homeostase vascular (BIRHAUS et al., 1997; GAO et al., 2008; KAY et al., 2016). Por exemplo, AGEs-RAGE aumenta a expressão de VCAM-1 e de IL-6 no endotélio vascular (WAUTIER et al., 1996; RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2011).

Alguns autores acreditam que a curto prazo a ativação de RAGE pode contribuir para a homeostase e reparação dos tecidos, promovendo a proliferação e diferenciação celular, enquanto que, a longo prazo (semanas ou meses) a ativação de RAGE desencadeada por altas concentrações de seus ligantes pode ser deletéria, amplificando e prolongando a resposta inflamatória, causando a proliferação, migração celular excessiva e o acúmulo de ROS. Desse modo, a capacidade e a quantidade de ligantes de RAGE, as células e tecidos onde estão presentes, parecem desempenhar um papel fundamental no comportamento desse receptor, condicionando o resultado da sua sinalização (SORCI et al., 2013).

2.8.3.2 A via do poliol e a via da PKC

Outras vias bioquímicas estão vinculadas aos efeitos adversos da hiperglicemia e as complicações cardiovasculares, como é o caso da via do poliol e da via DAG-PKC. (KEOGH; DUNLOP; LARKINS, 1997). É importante ressaltar que níveis elevados de glicose podem alterar as vias de transdução de sinal, afetando a expressão gênica e a função proteica levando a disfunção e danos celulares (GERALDES; KING, 2010).

A via do poliol é considerada a principal contribuinte do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia (GABBAY, 1975). A aldose redutase é a primeira enzima da via do poliol responsável por reduzir os aldeídos tóxicos celulares para álcoois inativos. Em pacientes hiperglicêmicos a aldose redutase também reduz a glicose em sorbitol, utilizando o NADPH como cofator (SHAH et al., 1997). O NADPH é um cofator essencial para a regeneração de antioxidantes intracelulares, como a glutatona reduzida pela enzima glutatona redutase. Desse modo, a utilização de NADPH pela aldose redutase pode contribuir com o aumento do

estresse oxidativo e com o desenvolvimento das complicações diabéticas, devido ao aumento do estresse osmótico, ao aumento citosólico do NADH/NAD, a diminuição do NADPH, bem como pela redução da atividade da Na/K/ATPase (BARNET et al., 1986; CHUNG; CHUNG, 2005).

A segunda enzima da via do poliol, a sorbitol desidrogenase, converte o sorbitol em frutose, utilizando como cofator o NAD⁺. A frutose produzida pode ser fosforilada a frutose-3 fosfato que, por sua vez, pode ser dividida em 3-desoxiglucose e 3-desoxiglucosona. Estes dois compostos são agentes de glicação que podem resultar na produção de AGEs (MATHEBULA, 2015).

É bem conhecido que, a glicose pode ser metabolizada diretamente a diacilglicerol (DAG), por um processo envolvendo a conversão do fosfato de dihidroxiacetona, intermediário da triose fosfato, produzido quando a glicose-6-fosfato é utilizada na glicólise ou na via das pentoses fosfato (XIA et al., 1994; STEINBERG, 2008; GERALDES; KING, 2010). Este intermediário é reduzido ao glicerol-3-fosfato, o que aumenta a síntese de novo de DAG. O diacilglicerol é um cofator das isoformas clássicas da PKC, β , δ e α (WOLF et al., 1991). A ativação da PKC resulta em vários efeitos na expressão gênica, como redução do óxido nítrico e aumento da endotelina-1, do fator de crescimento transformante- β , do inibidor-1 do ativador do plasminogênio, do NF- κ B e da NADPH-oxidase. A ativação da PKC também eleva a atividade da fosfolipase A2, com aumento de dois inibidores da Na/K/ATPase: o ácido araquidônico e a prostaglandina E2 (XIA et al., 1994). No diabetes, os níveis de DAG estão elevados na retina (SHIBA et al., 1993), aorta, coração (INOUCHI et al., 1992), glomérulos renais (ISHII et al., 1996), fígado e músculos esqueléticos (VAN HERPEN; SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008).

O excesso de glicose também pode ser desviado para a via da hexoxamina, onde é convertido em frutose-6-fosfato, substrato para a glicosilação de proteínas. A frutose-6-fosfato é transformada em N-acetilglicosamina 6-fosfato e posteriormente, convertida a uridina difosfato-N-acetil glucosamina. Esta pode modular a expressão de fatores de transcrição e alterar a expressão de várias proteínas, como o PAI-I e o fator de crescimento TGF- β , envolvidos nas complicações diabéticas (DU et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a repercussão tempo dependente do estresse oxidativo e do metabolismo glicêmico e lipídico no desenvolvimento das complicações cardiovasculares na prole causadas pelo diabetes gestacional.

3.2. ESPECÍFICOS

- Induzir o diabetes gestacional em ratas Wistar pela administração de STZ e analisar na prole os seguintes parâmetros:
 - a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina;
 - as taxas plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL;
 - a concentração de glicogênio hepático e muscular;
 - os níveis de ROS e nitritos na aorta e no coração;
 - a atividade das enzimas antioxidantes da superóxido dismutase e da catalase, bem como os níveis de glutathione reduzida e glutathione oxidada na aorta e no coração;
 - a expressão proteica da isoforma 4 da NADPH oxidase (Nox4) e do RAGE na aorta e no coração;
 - a concentração de colágeno e a densidade capilar no coração.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados machos e fêmeas da linhagem Wistar, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, mantidos à temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/ escuro padrão (12 horas claro/12 horas escuro), água e ração (Labina®, Presence) *ad libitum*. Os protocolos foram realizados obedecendo as normas preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 23076.011857/2014-81) (Anexo A).

4.2 FÁRMACOS E REAGENTES

Os fármacos utilizados neste estudo foram: a epinefrina (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), a insulina humana regular (Humulin® R, LillyFrance S.A.S., Fegersheim, França), o pentobarbital sódico (CEVA Santé Animale, Rutherford, NJ, EUA) e a STZ (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA).

Os anticorpos primários: anti-Nox4, anti α -actinina e GAPDH foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA), enquanto que o anti-RAGE da Cell Signaling (Beverly, MA). Os anticorpos secundários: anti-rabbit, anti-goat e anti-mouse também foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA).

Os reagentes listados foram utilizados para os experimentos descritos nas seções subsequentes: 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), aprotinina (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), ácido benzoico (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ), álcool absoluto (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), álcool etílico (Isofar, Duque de Caxias, RJ), carbonato de sódio (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ), citrato de sódio (Isofar, Duque de Caxias, RJ), cloreto de sódio (Isofar, Duque de Caxias, RJ), cloreto de magnésio (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ), diclorofluoresceína (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), dodecil sulfato de sódio - SDS (Amresco, Solon, EUA), eletoluminescência - ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino

Unido), formol (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), fosfato de sódio (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ), glicerol (Amresco, Solon, EUA), glicose (Isofar, Duque de Caxias, RJ), glutatona reduzida (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), glutatona oxidada (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), hidróxido de potássio - KOH (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ), hidróxido de sódio - NaOH (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ), kit ELISA para dosagem de insulina (Millipore[®], Abacus AIS, Brisbane, Queensland, Austrália), kits para análise da glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL (Labtest Diagnóstica - Lagoa Santa-MG, Brasil), leupeptina (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), membrana de Fluoreto Polivinidileno - PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), N-etilmaleimida (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), nitrito de sódio (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), ortovanadato de sódio (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), O-ftalaldeído - OPT (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), pepstatina (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), N-etilmaleimida - NEM (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), peróxido de hidrogênio - H₂O₂ (Merck, Darmstad, Alemanha), fenil-metil sulfonil fluoreto - PMSF (Sigma Chem. Co., St Louis, USA), reagente de bradford (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), reagente de Griess (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), reativo de antrona (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), sulfato de sódio - Na₂SO₄ (Vetec Química Fina LTDA - Rio de Janeiro, RJ), TRIS-Base (Amresco, Solon, EUA), Tween-20 (Amresco, Solon, EUA), xilol (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA). A água utilizada nos experimentos foi a deionizada (Benzoquímica[®], Olinda, PE).

4.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Fêmeas nulíparas (230 a 250g, n = 20) aos três meses de idade, foram acasaladas na proporção 1:1. Diariamente no período da manhã, os machos foram separados e esfregaços vaginais foram realizados. Nas fêmeas, uma pipeta de Pasteur contendo solução salina (0,9%) foi introduzida superficialmente no canal vaginal e o material coletado foi depositado sobre lâminas de vidro devidamente identificadas, para leitura imediata em microscópio óptico (40x) (modelo Eclipse E100, Nikon, Tóquio, Japão). A presença de espermatozoides, indicou o primeiro dia de prenhez. No 7º dia de gestação, após um período de 8 horas de jejum diurno, o diabetes foi induzido com uma dose única de estreptozotocina (STZ, 50 mg/kg) por via intraperitoneal, dissolvida em tampão citrato 0,01 M (pH 4,5). O mesmo procedimento foi

realizado com fêmeas controles não diabéticas que receberam apenas o veículo (tampão citrato).

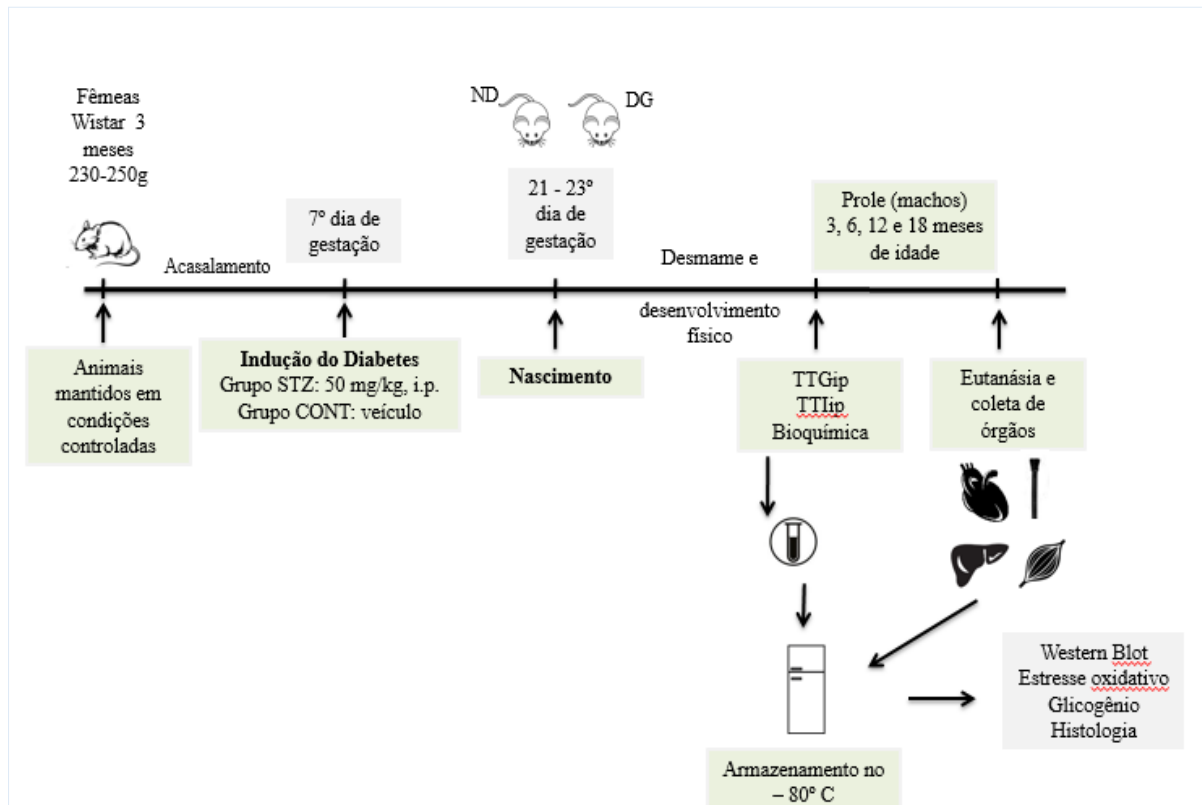
O nível de glicose das fêmeas foi avaliado através de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal para coleta sanguínea. Uma gota de sangue foi aplicada sobre uma tira teste e dosada com o auxílio de um glicosímetro Optium mini® (Abbott, Chicago, EUA) no 3º, 5º e 14º dia após a administração de STZ. No 3º e 5º foi avaliada a glicemia pós-prandial e no 14º dia a glicemia em jejum. Fêmeas com glicemia de jejum acima de 200 mg/dL foram consideradas diabéticas. Animais com níveis glicêmicos abaixo do valor estipulado foram descartados.

Cada fêmea prenhe foi transferida para uma gaiola separada. Após o nascimento, a prole foi reduzida a um número de 6 animais por mãe e dividida em dois grupos de acordo com o tratamento materno: controle (ND) e diabetes gestacional (DG). Os grupos foram compostos por animais de ninhadas diferentes, reduzindo os possíveis efeitos quando se utiliza animais de apenas uma ninhada por casal reprodutor. O desmame ocorreu depois de 21 dias do início da lactação. Após esse período as proles foram avaliadas aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade. Apenas a prole composta por machos (n = 5 a 8 animais por grupo) foi utilizada nos experimentos aqui delineados. A Figura 6 representa esquematicamente o protocolo experimental desenvolvido.

4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE INTRAPERITONEAL (TTGip)

Para confirmar as alterações no metabolismo glicídico, foi realizado o TTGip. Após jejum noturno de 12h, os animais de ambos os grupos ND e DG, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Após 15 minutos da indução anestésica, foi administrada uma solução de glicose a 50% (2 g/kg, i.p.). Foram coletadas amostras de sangue através de uma pequena incisão na extremidade da cauda dos animais para determinação da glicemia basal (considerado tempo 0) e após a sobrecarga de glicose nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos utilizando Optium mini® (Abbott, Chicago, EUA). A área sob a curva foi determinada pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990).

Figura 6 – Desenho experimental.



Fêmeas Wistar nulíparas (230 a 250g, n = 20) aos três meses de idade, foram acasaladas. Após confirmação da prenhez, o diabetes gestacional foi induzido no 7º dia de gestação com uma dose única de STZ (50 mg/kg, i.p.) dissolvida em tampão citrato 0,01 M (pH 4,5). Fêmeas controles (CONT) receberam apenas o veículo (tampão citrato). Ao nascimento, a prole foi dividida de acordo com o tratamento materno em: controle (ND) e diabetes gestacional (DG). O desmame ocorreu depois de 21 dias do início da lactação. Após esse período as proles, compostas apenas por machos (n = 5 a 8 animais por grupo) foram avaliadas aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade em relação aos TTGip, TTIip e parâmetros bioquímicos. Os animais foram eutanasiados e após toracotomia o coração e a aorta foram armazenados no freezer a -80°C, para realização do *Western blot* e estresse oxidativo. O fígado e o músculo tibial foram utilizados para determinação do glicogênio. A análise histológica da deposição de colágeno e densidade capilar foi realizada no ventrículo esquerdo.

Fonte: A autora (2017).

4.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (TTIip)

O TTIip foi realizado para avaliar a sensibilidade periférica à insulina. Após jejum noturno de 12h, os animais de ambos os grupos ND e DG, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e após 15 minutos foi administrada 1,5U/kg de insulina Regular por via i.p. Foram coletadas amostras de sangue através de uma pequena incisão na extremidade da cauda dos animais para determinação da glicemia nos períodos de 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 30 minutos em glicosímetro Optium mini® (Abbott, Chicago, EUA). A razão da constante de decaimento da glicose (KITT) foi calculada usando-se a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O

decaimento da glicose foi analisado com base na queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear (BONORA et al., 1987). A área sob a curva foi determinada pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990).

4.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Após jejum noturno (12h), os animais de ambos os grupos ND e DG foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Após 15 minutos, amostras de sangue foram obtidas pelo plexo retro-orbital, por meio de tubos capilares heparinizados. O sangue foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 4.500 r.p.m. (modelo NT 805, Nova Técnica, Brasil) durante 15 min, em temperatura ambiente, para determinação da concentração plasmática de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL pelo método enzimático colorimétrico, utilizando “kits” comerciais específicos, de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi realizada em espectrofotômetro (modelo Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 500nm para leitura do colesterol total e colesterol HDL e a 505nm para leitura da glicose e triglicerídeos. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Os níveis de insulina plasmáticos da prole com 18 meses de idade foram avaliados pelo método de Elisa Sanduíche e foram expressos em ng/mL. Aos 18 meses de idade, também foram determinados os índices HOMA-IR e HOMA-β, para estimar a resistência à insulina e a capacidade funcional das células β, respectivamente (MATTHEWS et al., 1985). Para obtenção destes índices, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

HOMA-IR: $(\text{Glicemia em jejum} \times 0,0555) * \text{Insulina em jejum} (\mu\text{UI/mL}) / 22,5$.

HOMA-β: $(20 \times \text{Insulina em jejum}) / (\text{Glicemia em jejum} \times 0,0555) - 3,5$.

*Para transformar a glicemia em jejum de mg/dL em nmol/L multiplicar por 0,0555.

4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os animais foram eutanasiados sob anestesia (pentobarbital sódico, 50mg/kg, i.p.). Após toracotomia o coração das proles aos 12 e 18 meses de idade e a aorta torácica das proles aos 3, 6 e 12 meses de idade foram removidos, pesados e lavados com solução

fisiológica (0,9%). Após remoção do tecido gorduroso e tecido conectivo, a aorta e o coração (ventrículos) foram colocados em tubos criogênicos, devidamente identificados e imersos em nitrogênio líquido (-196°C). Em seguida, foram armazenados no freezer a -80°C (modelo MDF-U33V-PE, Sanyo/ Panasonic, Canadá) para análise do estresse oxidativo e da expressão proteica. O fígado e o músculo tibial anterior das proles ND e DG aos 3, 6 e 12 meses de idade foram retirados para dosagem do glicogênio. Uma pequena amostra de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) foi imersa em uma solução de formol tamponado a 10% para realização da análise histológica.

4.8 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

A dosagem do glicogênio hepático e muscular foi realizada de acordo com o método de Carrol e colaboradores (1955). O procedimento envolve a digestão do tecido com KOH em ebulição, a desproteinização do resíduo alcalino com ácido benzóico e a produção de cor com o reagente antrona. Para isto, o músculo tibial anterior e 500mg de tecido hepático, de ambas as proles ND e DG aos 3, 6 e 12 meses de idade, foram digeridas em tubos de vidro contendo 2mL de KOH a 30% e levados ao banho-Maria a 100°C (modelo NI 1255, Nova Instruments, São Paulo, Brasil) por 60 minutos. Após esse período, foi pipetado em todos os tubos de ensaio, 60µL de solução saturada de sulfato de sódio e 4,5mL de álcool absoluto (99%). Os tubos foram agitados em vórtex (modelo AP 56, Phoenix, Brasil) e retornaram ao banho-Maria a 100°C por até 15 segundos. Na sequência, os tubos foram centrifugados (modelo Sorvall Legend Mach 1.6, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 2.500 r.p.m. a 25°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado por inversão dos tubos. Ao precipitado foram acrescentados 2mL de água destilada e levado ao banho-Maria a 100°C. Após dissolver o precipitado, foram pipetados 4,5mL de álcool absoluto (99%) sob agitação no vórtex. Os tubos retornaram ao banho-maria a 100°C por até 15 segundos e centrifugados a 2.500 r.p.m. a 25°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão dos tubos. Foram pipetados 2mL de ácido benzóico saturado e o precipitado foi dissolvido com o auxílio de um bastão de vidro. O volume foi transferido para uma proveta de 10mL.

No caso das amostras hepáticas, as provetas foram lavadas cinco vezes com 1,5mL de ácido benzóico saturado, sendo o volume final completado para 10mL. Para as amostras de tecido muscular, as provetas foram lavadas três vezes com 1mL de ácido benzóico saturado, sendo o volume final completado para 6mL. Para a primeira diluição das amostras hepáticas,

foram pipetados 9ml de ácido benzoico e acrescentado 1mL da amostra presente na proveta. Na segunda diluição, foram pipetados 0,75mL de água destilada e acrescentado 0,25mL da primeira diluição (valor total da diluição 200x).

Na primeira diluição das amostras musculares, foram pipetados 9ml de ácido benzoico e acrescentado 1mL da amostra presente na proveta. Para a segunda diluição, foram pipetados 0,5mL de água destilada e acrescentado 0,5mL da primeira diluição (valor total da diluição 60x). Na sequência, os tubos foram imersos em gelo e 2mL do reativo de antrona foi adicionado vagarosamente à solução. Os tubos foram agitados no vórtex e levados ao banho-Maria a 100°C por 10 minutos. Após resfriamento, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro para realizar a leitura em um comprimento de onda de 620nm. Uma curva padrão foi confeccionada a partir de uma solução de 0,1% de glicose dissolvida em ácido benzoico saturado de forma a fornecer soluções que contenham 20, 30 e 50µg por 1mL. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de glicogênio por tecido.

4.9 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.9.1 Preparação do homogenato e quantificação de proteínas

No momento da análise, as aortas e os corações foram descongelados e pesados. 50-100 mg de tecido foram macerados e homogeneizados em um agitador vertical (RW20 digital, IKA®, EUA) com tampão (Tris-Base + EDTA, ortovanadato de sódio e PMSF, em pH 7,4) durante 1 minuto. Na sequência, foram centrifugados à 10000 x g por 10 minutos, à temperatura de 0°C (modelo NT 805, Nova Técnica, São Paulo, Brasil), para obtenção do sobrenadante. Este último foi utilizado para a determinação da glutathiona reduzida, glutathiona oxidada, espécies reativas ao oxigênio, nitritos e atividades enzimáticas de superóxido dismutase e catalase no coração das proles aos 12 e 18 meses de idade e na aorta torácica das proles aos 3, 6 e 12 meses de idade. A determinação de proteína foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford e colaboradores (1976).

4.9.2 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A dosagem da glutathiona reduzida (GSH) foi realizada em aortas torácicas e no coração de acordo com o método de Hissin e Hilf (1976). O princípio desta técnica

corresponde à reação entre os grupos tióis (SH) da GSH e o composto fluorescente OPT. Para isto, em um eppendorf foram adicionados 20 µL da amostra (sobrenadante do homogenato proteico) e 180 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M + EDTA 5 mM (pH = 8). Em uma placa preta de 96 poços, foram adicionados 50 µL desta mistura, 140 µL de tampão fosfato 0,1 M e 10 µL do composto fluorescente (OPT). O branco constituiu apenas de 190 µL de tampão fosfato 0,1 M e 10 µL de OPT. Após 15 minutos de reação em temperatura ambiente e protegida da luz, a leitura foi realizada em fluorímetro em 350 nm de excitação e 420 nm de emissão (modelo Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os resultados foram expressos em nanomol /mg de proteína com referência a uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de GSH. O intervalo da curva padrão variou de 0,2 a 4,8µM.

4.9.3 Avaliação dos níveis de glutathiona oxidada (GSSG)

A dosagem da GSSG foi realizada em aortas torácicas e no coração de acordo com o método de Hissin e Hilf (1976). Para determinação das quantidades iniciais de GSSG nas amostras, torna-se necessário eliminar a GSH das mesmas, mas sem oxidá-la a GSSG, o que levaria a um falso positivo maior. Logo, 25 µL da amostra (sobrenadante do homogenato proteico) foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente, com 10 µL de NEM (0,04 M), um composto alquilante que se conjuga com a GSH mas sem oxidá-la. Na sequência, 430 µL de NaOH (0,1 M) foram adicionados. Um volume de 50 µL desta mistura, 140 µL de NaOH (0,1 M) e 10 µL de OPT foram pipetados em uma placa preta de 96 poços e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. A leitura foi realizada em fluorímetro com 350 nm de excitação e 420 nm de emissão (modelo Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os resultados foram expressos em nanomol/mg de proteína com referência a uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de GSSG. O intervalo da curva padrão variou de 0,04 a 2,0µM.

O cálculo da razão GSH/GSSG foi utilizado para estimar o estado redox tecidual.

4.9.4 Avaliação indireta da produção de óxido nítrico (NO)

Como o NO possui um tempo de meia vida muito curto (1-10s) sua determinação torna-se difícil. Desse modo, a mensuração de seus metabólitos, como o nitrito, é mais

frequentemente utilizada para avaliar a produção de NO. Os níveis de nitrito foram estimados utilizando o reagente de Griess, como descrito por Green e colaboradores (2010). Um volume de 50 μ L da amostra (sobrenadante do homogenato proteico) e 50 μ L do reagente de Griess foram adicionados em uma placa de 96 poços, incubados durante 10 min à temperatura ambiente. O reagente de Griess é formado por ácido sulfanílico e α -naftilamina que se complexam com o nitrito, formando um composto de diazônio detectável por espectrofotometria em um comprimento de onda de 540 nm (modelo Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os resultados foram expressos como nanomol/mg de proteína com referência a uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. O intervalo da curva padrão variou de 1 a 12 μ M.

4.9.5 Quantificação das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A produção de ROS foi avaliada através do método de Ohkawa, Ohishi e Yagi, (1979). Trata-se de um ensaio fluorimétrico utilizando o reagente de DCFH-DA, que é convertido a diclorofluoresceína (DCF). Esse composto é fluorescente, na presença de ROS. Um volume de 100 μ L da amostra (sobrenadante do homogenato proteico) e 100 μ L de DCFH-DA foram adicionados em uma placa preta de 96 poços e incubados durante 45 min à temperatura de 37°C. A fluorescência foi mensurada a 504 nm (excitação) e 529 nm (emissão) (modelo Varioskan™ Flash, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os valores foram expressos em unidades de fluorescência por miligrama de proteína.

4.9.6 Atividade enzimática da catalase (CAT)

A atividade enzimática da catalase foi avaliada de acordo com o método de Aebi (1984). Um volume de 70 μ L da amostra (sobrenadante do homogenato proteico) foi adicionado a 895 μ L de tampão de fosfato de sódio pH 7,0. A reação iniciou através da adição de 35 μ L de H₂O₂ a 300 mM em tampão fosfato de sódio. A constante (k) da taxa de decomposição de H₂O₂, à temperatura ambiente e pH 7,0, foi determinada por medição das alterações de absorbância durante 2,0 min a um comprimento de onda de 240 nm (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A atividade enzimática foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

4.9.7 Atividade total da superóxido dismutase (SOD)

Avaliação da atividade enzimática da SOD foi realizada de acordo com Mishra e Fridovich, (1972), à temperatura de 25 °C. Um volume de 80 µL da amostra (sobrenadante do homogenato proteico) foi adicionado a 900 µL de tampão carbonato de sódio (pH 10,2 em EDTA 0,1 mM). A reação foi desenvolvida através da adição de 20 µL de epinefrina a 30 mM (0,05% em ácido acético). A absorbância foi medida em comprimento de onda de 480 nm durante 2 minutos (modelo Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da oxidação de epinefrina. A atividade enzimática da SOD no tecido foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/ mg de proteína).

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA PELA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT*

Após descongelamento, as aortas de ambas as proles aos 3, 6 e 12 meses de idade e o coração (ventrículos) das proles aos 12 e 18 meses de idade, foram homogeneizados em 800µL de tampão de extração (3M KCl, 1M Hepes, 1M MgCl₂⁺, 0,5M EDTA, 10% glicerol, 1M DTT, 10% SDS, pH 7,4) contendo coquetel inibidor de proteases (1mg/mL de ortovanadato de sódio, 1mg/mL de aprotinina, 1mg/mL de leupeptina, 1mg/mL de pepstatina e 1mg/mL de PMSF). A concentração de proteína foi determinada pelo Método de Bradford. Extratos proteicos (50µg) foram separados por eletroforese em gel 10% de SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio-Poliacrilamida) e então, transferidos para uma membrana de PVDF utilizando o Mini Trans-Blot TurboTransfer System (Bio-Rad, Foster City, California, USA). Em seguida, a membrana foi colocada em solução de bloqueio (0,5% de leite em pó desnatado em TBS-Tween) durante 1h à temperatura ambiente. Após lavagem com Tampão Tris Tween -20 (TBST) (0,05M Tris, 0,15M NaCl, pH 7,5 e 1% Tween-20), 3 vezes por 10 min, em temperatura ambiente, as membranas foram então incubadas, à 4° C durante 12 horas, com anticorpo primário específico para as proteínas de interesse: Nox-4 (1:500) e RAGE (1:500). O anticorpo anti- α actinina (1:10.000) foi utilizado como controle da reação de Western Blot para as aortas e o anti-GAPDH (1:10.000) como controle para as amostras de coração. Após lavagem das membranas com TBST para remover o anticorpo primário, os “blots” foram incubados por 1h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário ligado à peroxidase: anti goat (para Nox4), anti rabbit (para RAGE e α -actinina) e

anti mouse (para GAPDH). Após a ligação do anticorpo secundário, foi acrescentada uma solução de ECL, que ao reagir com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma reação quimioluminescente que permitiu a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário. Estas foram capturadas pelo fotodocumentador Chemi-DocTMMP System (Bio-Rad Laboratories, Nova Iorque, EUA) e quantificadas pelo “Software” ImageJ 1,44 (National [U1] Institutes of Health, EUA) e pelo Software Image Lab 5.0 Software (Bio-Rad Laboratories, Nova Iorque, EUA).

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E DENSIDADE CAPILAR

A avaliação histológica da deposição de colágeno e a da densidade capilar foi realizada por métodos anteriormente descritos e validados (KAHN, 2003; GIROIX et al., 2011; HOWARD et al., 2011). Amostras de tecido cardíaco (ventrículo) de ambos os grupos aos 18 meses de idade, foram mergulhadas em uma solução de formol neutra e tamponada a 10%, por 24 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes a 85%, 95%, Absoluto I, Absoluto II, Absoluto III, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Para cada fragmento foram confeccionados cortes semisseriados com espessura de 5 µm, utilizando um micrótomo manual (modelo Rotary 820, Leyca®, Mannheim, Alemanha). Em seguida os cortes foram fixados em lâminas preparadas com albumina e mantidos em estufa (modelo 315 SE, Fanem, São Paulo, Brasil) à temperatura de 37 °C, por 24 horas para secagem. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração por hematoxilina-eosina (H.E.) para a descrição histomorfométrica e picrosirius red para determinar a deposição cardíaca de colágeno ($\pm$ 15 seções de cada amostra). As imagens histológicas das lâminas foram capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico sob foco fixo e clareza de campo (modelo E200, Nikon, Tóquio, Japão), obtendo-se 30 campos por animal com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas utilizando o software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, EUA).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados coletados foi realizada no programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram expressos em médias $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). O teste t de Student não pareado foi utilizado. Para análise de bloco foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Os níveis de glicose em jejum observados nas fêmeas foram cinco vezes maiores no 14º dia após a administração de STZ ($410,0 \pm 27,0$ mg/dL, $n = 6$) quando comparados ao grupo controle ($80,0 \pm 1,5$ mg/dL, $n = 6$). Verificou-se um quadro de polidipsia, polifagia, poliúria (dados não mostrados), bem como, redução do peso corporal até o final da lactação (CONT, $270,0 \pm 3,7$ g vs. STZ, $200,0 \pm 6,1$ g, $p < 0,001$, $n = 6$). O peso corpóreo não foi diferente entre os grupos no período pré-gestacional (CONT, $230,0 \pm 5,9$ g vs. STZ, $240,0 \pm 6,0$ g, $p > 0,05$, $n = 6$).

É importante ressaltar que, a taxa de natalidade nas fêmeas do grupo controle seguiram o padrão reprodutivo esperado para a linhagem de ratos Wistar, enquanto que as fêmeas diabéticas induzidas por STZ apresentaram ninhadas menores (CONT, $11,0 \pm 1,0$ vs. STZ, $7,0 \pm 0,73$, $p < 0,01$, $n = 6$).

5.2 EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE O PESO CORPORAL DA PROLE AO NASCIMENTO, AOS 3, 6, 12 E 18 MESES DE IDADE

Para evitar a possibilidade de rejeição, apenas alguns ($n = 8$) animais oriundos de ratas diabéticas foram pesados ao nascimento. Foi observado que o peso corporal (PC) deste grupo foi significativamente ($p < 0,001$) reduzido quando comparado ao grupo ND, ($5,7 \pm 0,09$ vs. $6,5 \pm 0,08$ g, respectivamente). O PC do grupo DG manteve-se significativamente ($p < 0,001$) abaixo do grupo ND nas proles adultas em todas as idades estudadas (Tabela 4).

5.3 EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS DAS PROLES ADULTAS

Aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade, os níveis de triglicerídeos plasmáticos na prole DG foram em torno de 70, 40, 69 e 53% respectivamente maiores em relação a prole ND. Os níveis de glicose em jejum, colesterol total e colesterol HDL nas proles ND e DG foram similares aos 3, 6 e 12 meses. Entretanto, aos 18 meses os animais DG apresentaram-se hiperglicêmicos quando comparados aos ND (Tabela 4).

Tabela 4 - Peso corporal (g) e perfil metabólico (mg/dL) da prole de ratos expostos ao diabetes gestacional (DG), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparado aos controles (ND), aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade.

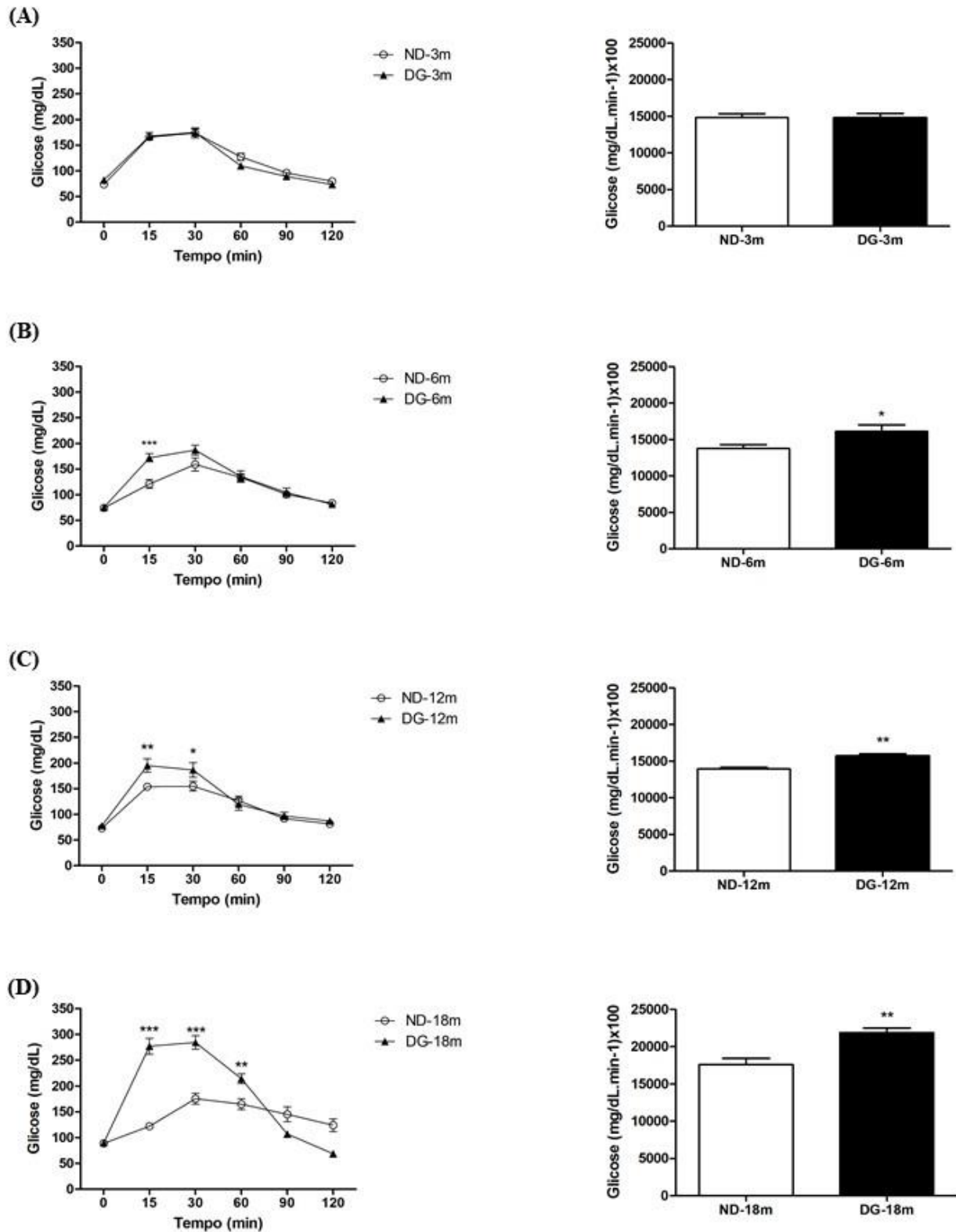
	Grupo ND				Grupo DG			
	3	6	12	18 Meses	3	6	12	18 Meses
Peso corporal	340,0±5,3	410,0±5,3	500,0±9,0	590,0±5,9	270,0±9,2 ***	340,0±6,0***	420,0±8,0***	500,0±2,2***
Glicose em jejum	76,0±3,7	79,0±2,1	83,0±2,7	80,0±2,9	85,0±3,6	82,0±3,2	84,0±2,4	120,0±2,2***
Triglicerídeos	33,0±3,3	37,0±4,8	49,0±3,2	51,0±2,3	56,0±2,2***	52,0±2,9*	83,0±6,8***	78,0±3,5***
Colesterol total	51,0±2,4	68,0±1,2	72,0±2,7	63,0±2,1	52,0±2,0	64,0±3,3	76,0±3,7	62,0±2,1
Colesterol HDL	33,0±1,8	29,0±1,3	25,0±1,0	29,0±2,1	32,0±1,0	31,0±1,3	25,0±1,7	35,0±4,0

Os valores estão expressos como média ± e.p.m; n = 6; *p < 0,05; ***p < 0,001 vs. ND (ANOVA a duas vias; pós-teste: *Bonferroni*).

5.4 EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE A TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL E A SENSIBILIDADE À INSULINA NAS PROLES ADULTAS

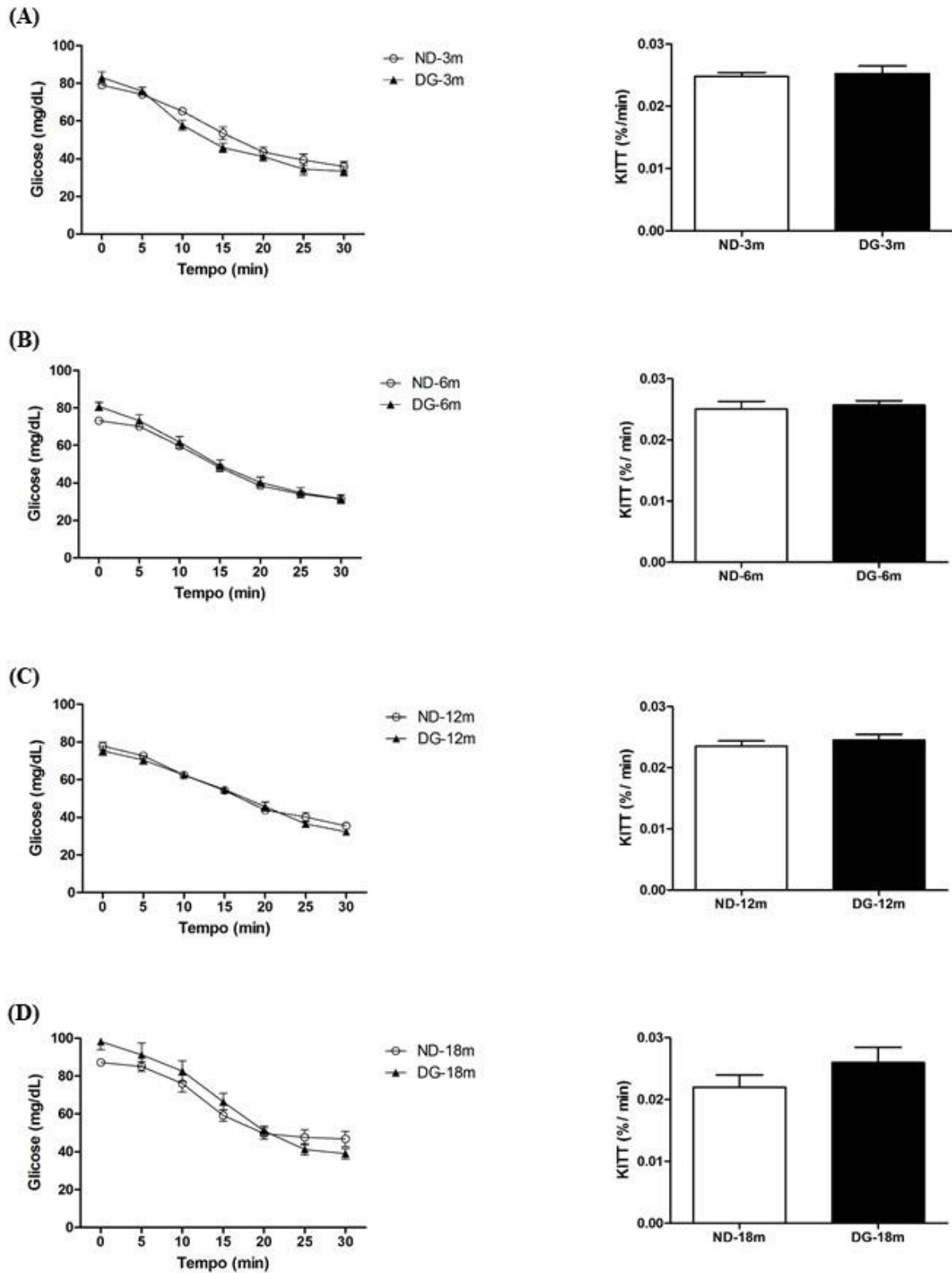
Aos 3 meses de idade, os animais do grupo DG não apresentaram intolerância à glicose. Contudo, aos 6 meses de idade, os níveis glicêmicos após a administração i.p. de glicose foram significativamente maiores ($p < 0,001$) no grupo DG aos 15 minutos do teste, bem como aos 12 meses de idade aos 15 ($p < 0,01$) e 30 ($p < 0,05$) minutos quando comparados ao grupo ND. Aos 90 e 120 minutos a glicemia retornou ao valor basal em todos os grupos. Aos 18 meses de idade a glicemia permaneceu significativamente elevada aos 15, 30 e 60 minutos do teste. Estes resultados foram confirmados através do cálculo da área sob a curva (Figura 7). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de glicose na prole DG aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade durante o TTlip, quando comparada a prole ND. A razão da constante de decaimento da glicose (KITT) não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos DG e ND aos 3, 6 e 12 e 18 meses de idade (Figura 8). Entretanto, o nível plasmático de insulina foi aproximadamente 64% menor nos animais DG aos 18 meses de idade quando comparados ao grupo ND (Figura 9), bem como os índices HOMA-IR (ND, $22,0 \pm 1,9$ vs. DG, $11,0 \pm 0,86$, $p < 0,001$, $n = 6$) e HOMA- β (ND, $1800,0 \pm 410,0$ vs. DG, $240,0 \pm 19,0$, $p < 0,01$, $n = 6$).

Figura 7 - Tolerância à glicose intraperitoneal e área sob a curva das proles aos 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 (D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, triângulos pretos) induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.) comparadas aos controles não diabéticos (ND, círculos abertos).



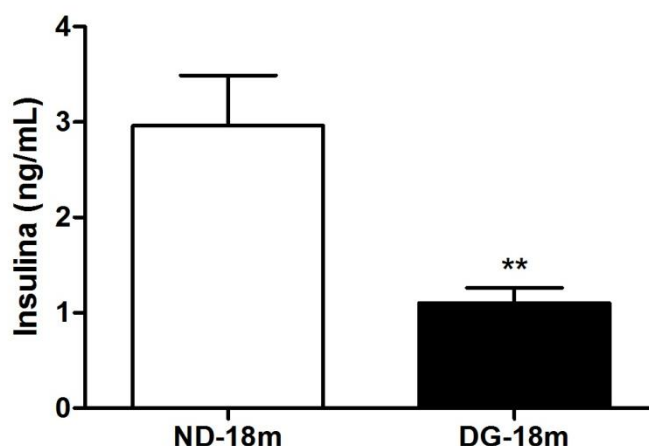
Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA a duas vias; pós-teste: Bonferroni; Teste t de Student; $n = 7$).

Figura 8 - Tolerância à insulina e constante de decaimento da glicose (KITT) das proles aos 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 (D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, triângulos pretos), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparados aos controles não diabéticos (ND, círculos abertos).



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. ($p > 0,05$; ANOVA a duas vias; pós-teste: Bonferroni; Teste t de Student; $n = 7$).

Figura 9 - Nível plasmático de insulina das proles aos 18 meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



Os valores representam média $\pm$ e.p.m; ** $p < 0,01$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

5.5 EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS NÍVEIS DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR NA PROLE AOS 3, 6 E 12 MESES DE IDADE

Aos 6 e 12 meses de idade, a concentração de glicogênio hepático (%), apresentou-se reduzida, em torno de 38 e 55% respectivamente, na prole DG em relação a prole ND. Todavia, não foram observadas diferenças significativas na concentração de glicogênio muscular (%) (Tabela 5) entre os grupos DG e ND.

Tabela 5 - Níveis de glicogênio hepático e muscular (%) da prole de ratos expostos ao diabetes gestacional (DG), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparada aos controles (ND), aos 3, 6, e 12 meses de idade.

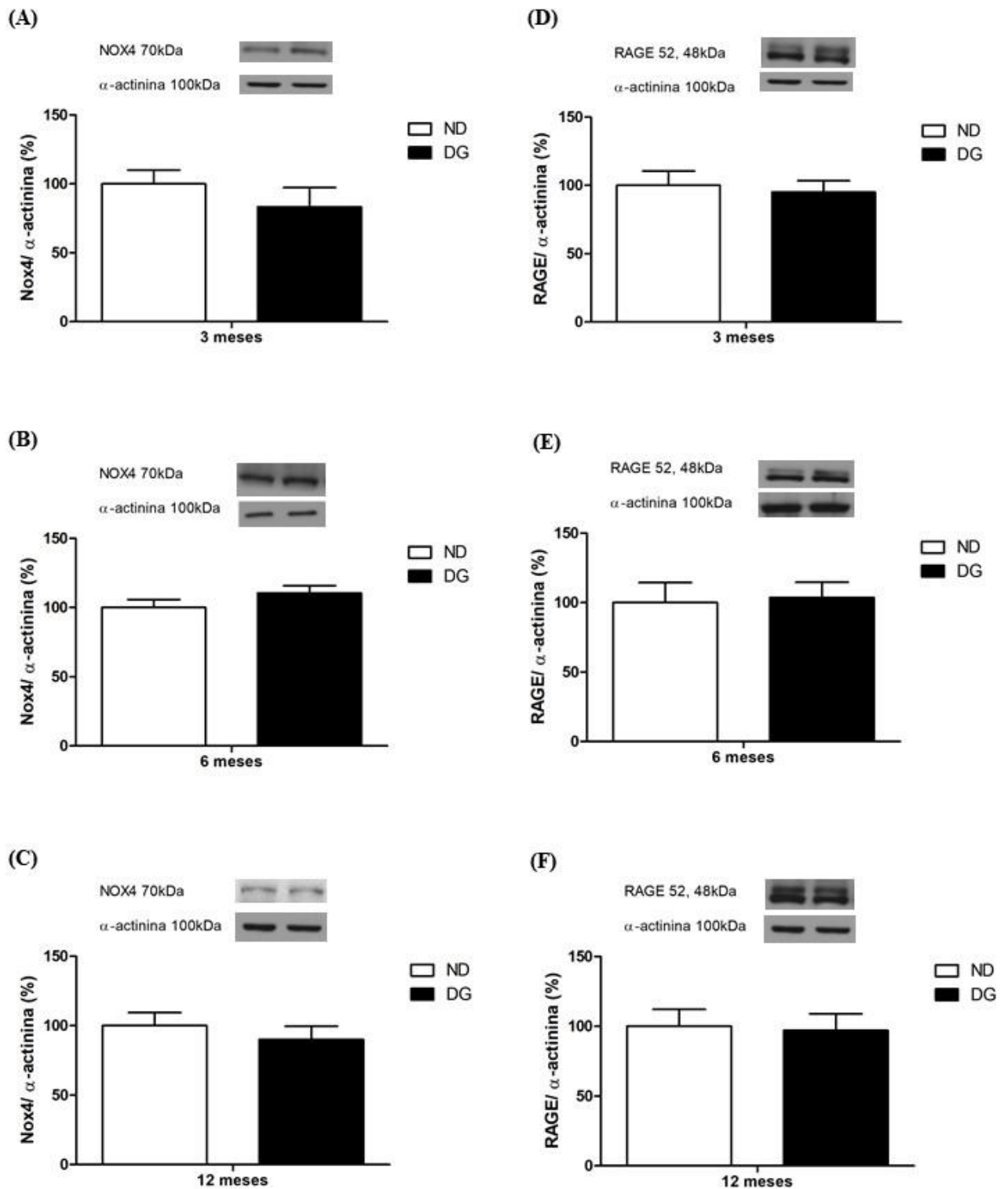
	Grupo ND			Grupo DG		
	3	6	12 Meses	3	6	12 Meses
Glicogênio hepático	5,7 $\pm$ 0,05	6,1 $\pm$ 0,26	3,1 $\pm$ 0,35	5,8 $\pm$ 0,43	3,8 $\pm$ 0,37***	1,4 $\pm$ 0,10**
Glicogênio muscular	0,60 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,01

Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m; $n = 5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. ND (ANOVA a duas vias, pós-teste: *Bonferroni*).

5.6 EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE A EXPRESSÃO PROTEICA DA NOX4 E DO RAGE EM AORTAS DAS PROLES AOS 3, 6 E 12 MESES DE IDADE E NO CORAÇÃO DA PROLE AOS 12 E 18 MESES DE IDADE

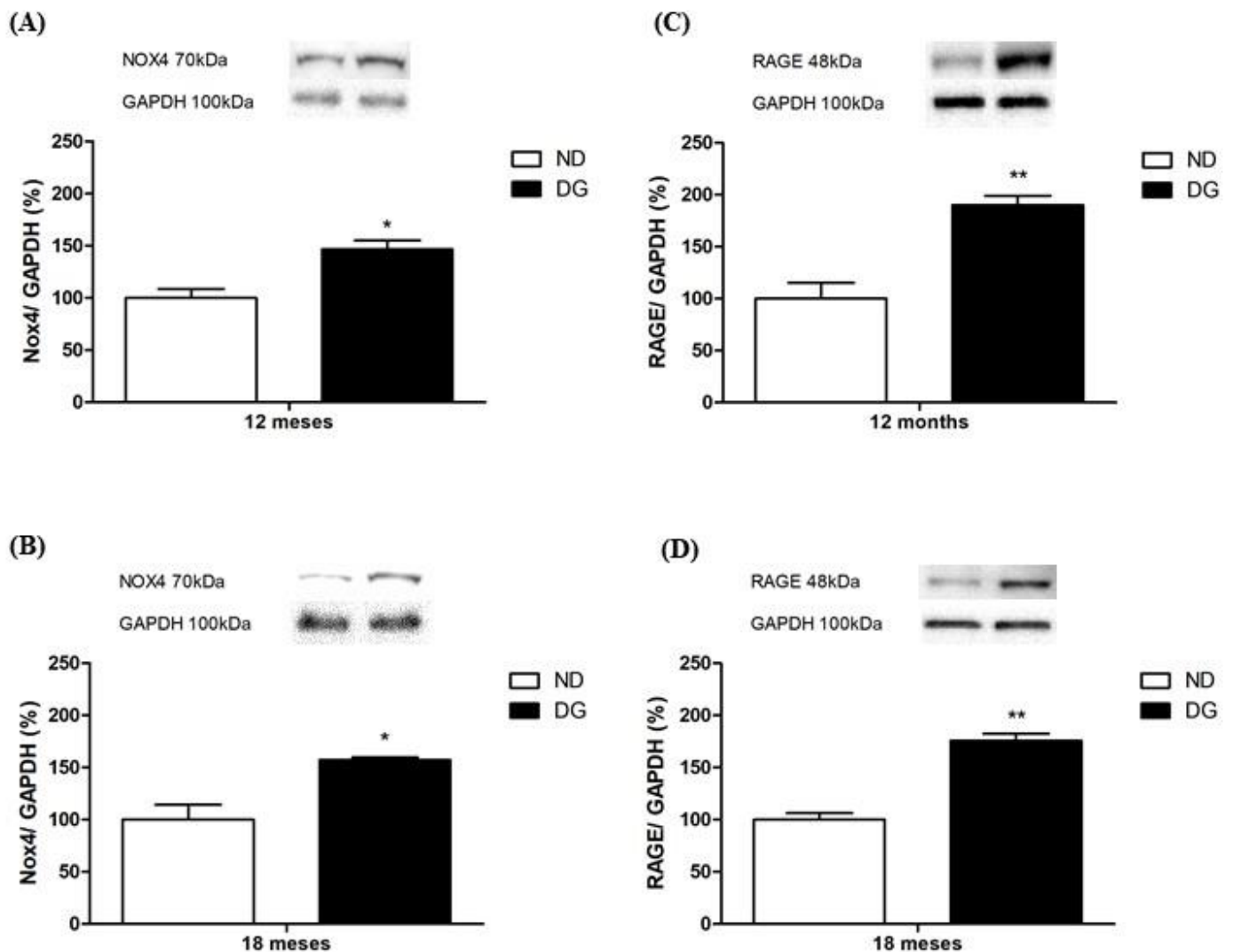
A expressão proteica do RAGE e da Nox 4 (Figura 10) não foram significativamente alteradas em aortas oriundas dos grupos experimentais aos 3, 6 e 12 meses de idade. Porém, no coração da prole DG aos 12 e 18 meses, foi observado um aumento na expressão proteica da Nox4 e do RAGE (Figura 11) quando comparada a prole ND.

Figura 10 - Expressão proteica da Nox4 e do RAGE na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, colunas pretas), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, colunas brancas).



Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de três experimentos independentes. $p > 0,05$; Teste t de Student não pareado, $n = 5$ animais por grupo.

Figura 11 - Expressão proteica da Nox4 e do RAGE no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, colunas pretas), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, colunas brancas).



Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste t de Student não pareado, $n = 5$ animais por grupo.

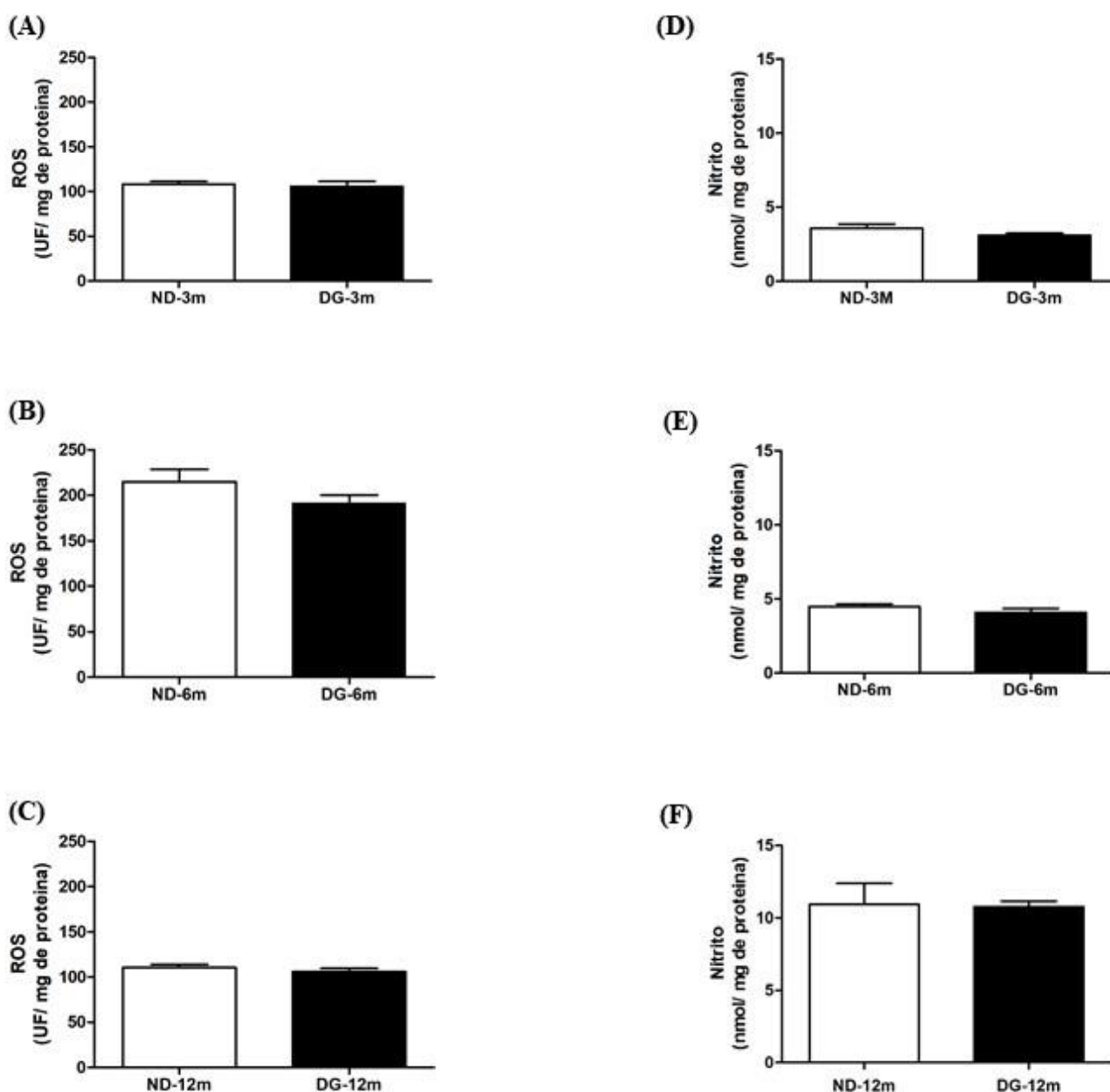
5.7 EFEITO DO DIABETES GESTACIONAL SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM AORTAS DA PROLE AOS 3, 6 E 12 MESES DE IDADE E NO CORAÇÃO DA PROLE AOS 12 E 18 MESES DE IDADE

Não foram observadas diferenças significativas na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitritos, na aorta da prole DG aos 3, 6 e 12 meses de idade quando comparados aos seus controles (Figura 12). Os níveis de glutathiona (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 13), bem como a razão GSH/GSSG (Figura 14) e a atividade da

superóxido dismutase e da catalase (Figura 15) também não foram estatisticamente diferentes entre os grupos.

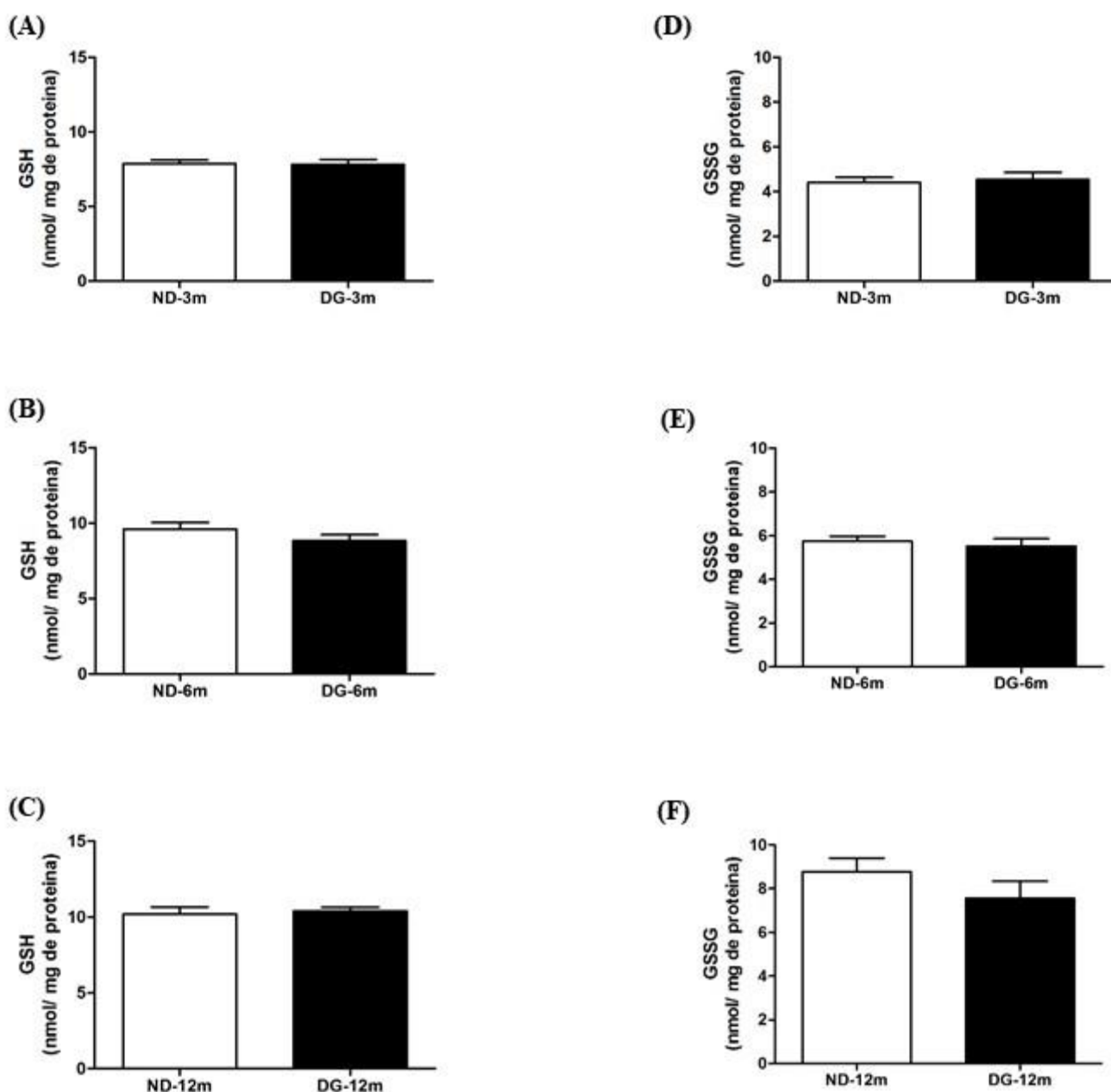
No coração da prole DG aos 12 e 18 meses de idade, foi observado uma redução nos níveis de nitritos, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 16), bem como uma redução nos níveis de glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 17) e na razão GSH/GSSG (Figura 18). A atividade da superóxido dismutase e da catalase (Figura 19) também se apresentaram reduzidas na prole DG quando comparada a prole ND.

Figura 12 - Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitritos na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



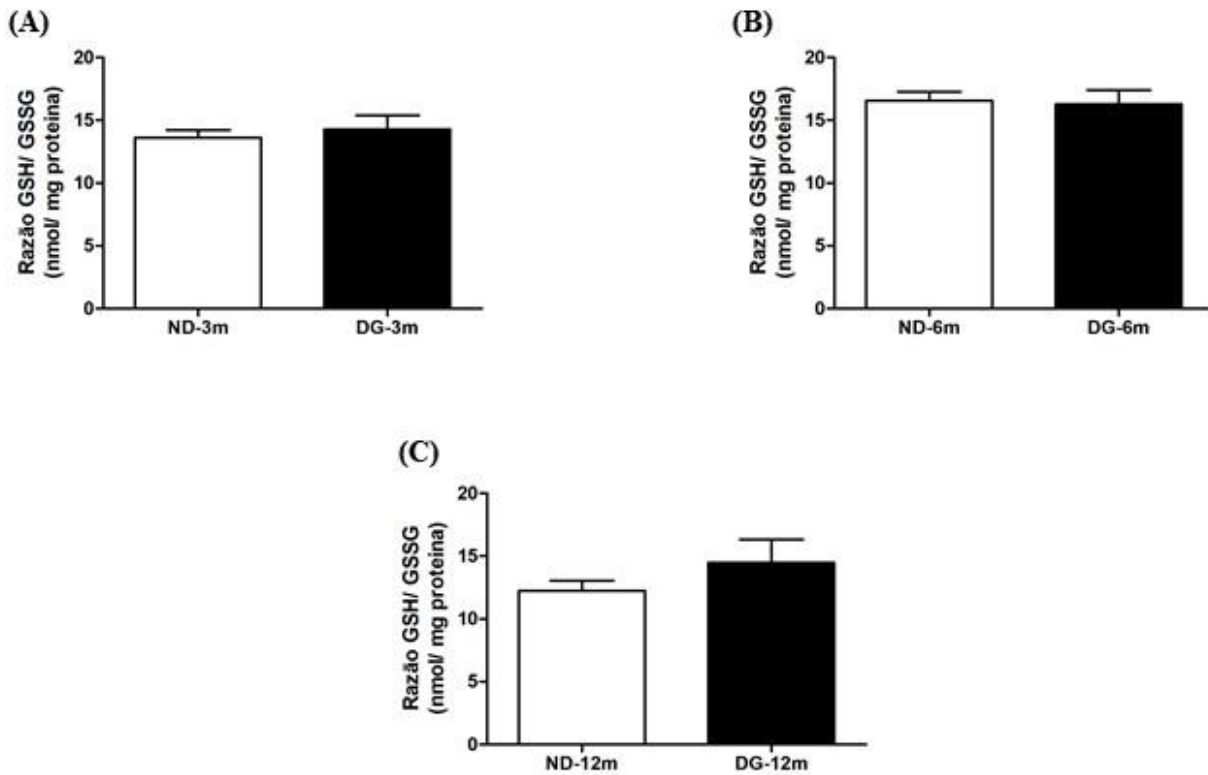
Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $p > 0,05$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

Figura 13 - Concentração de glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



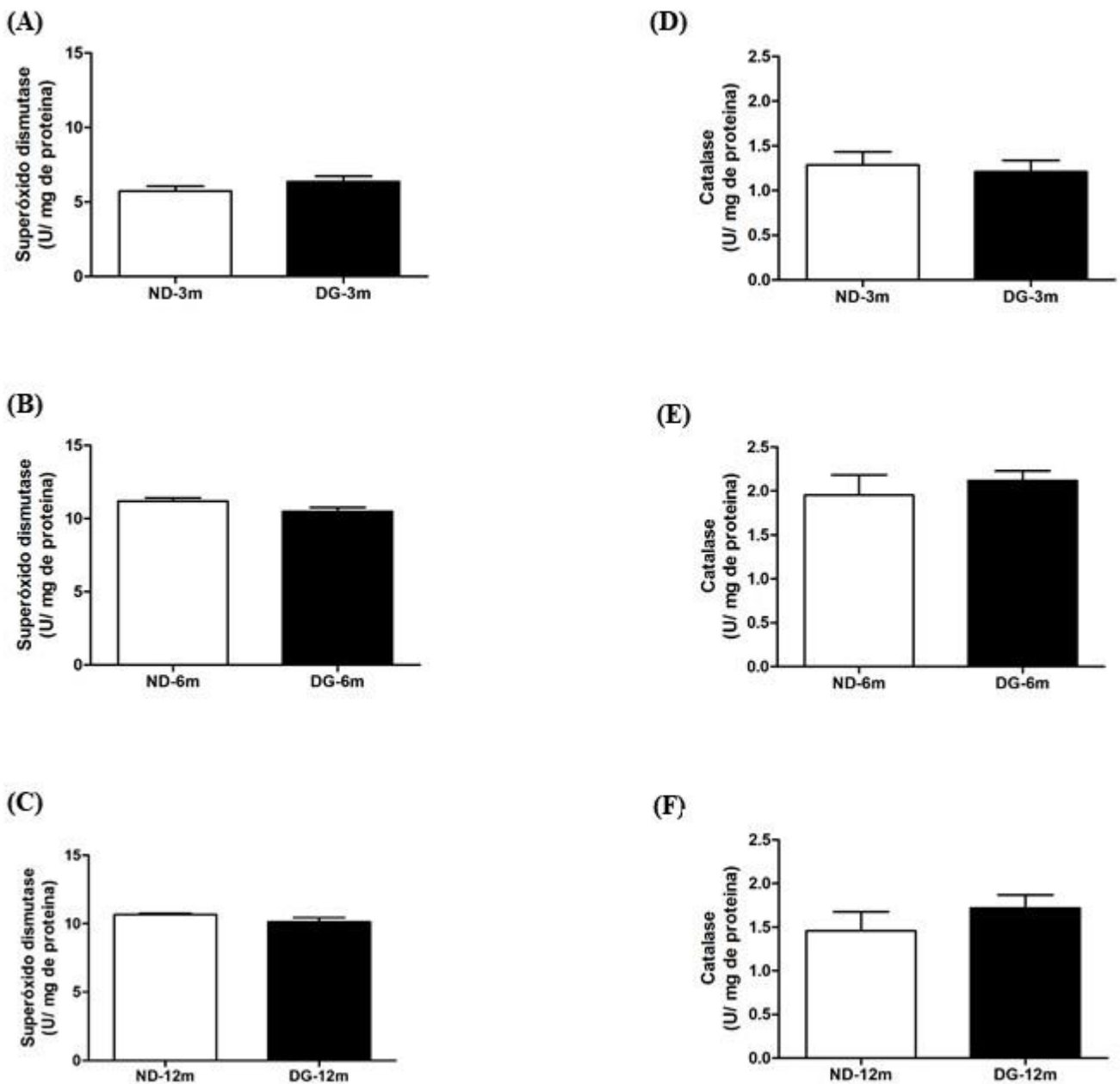
Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $p > 0,05$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

Figura 14 - Razão da glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) na aorta das proles aos 3 (A), 6 (B) e 12 (C) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



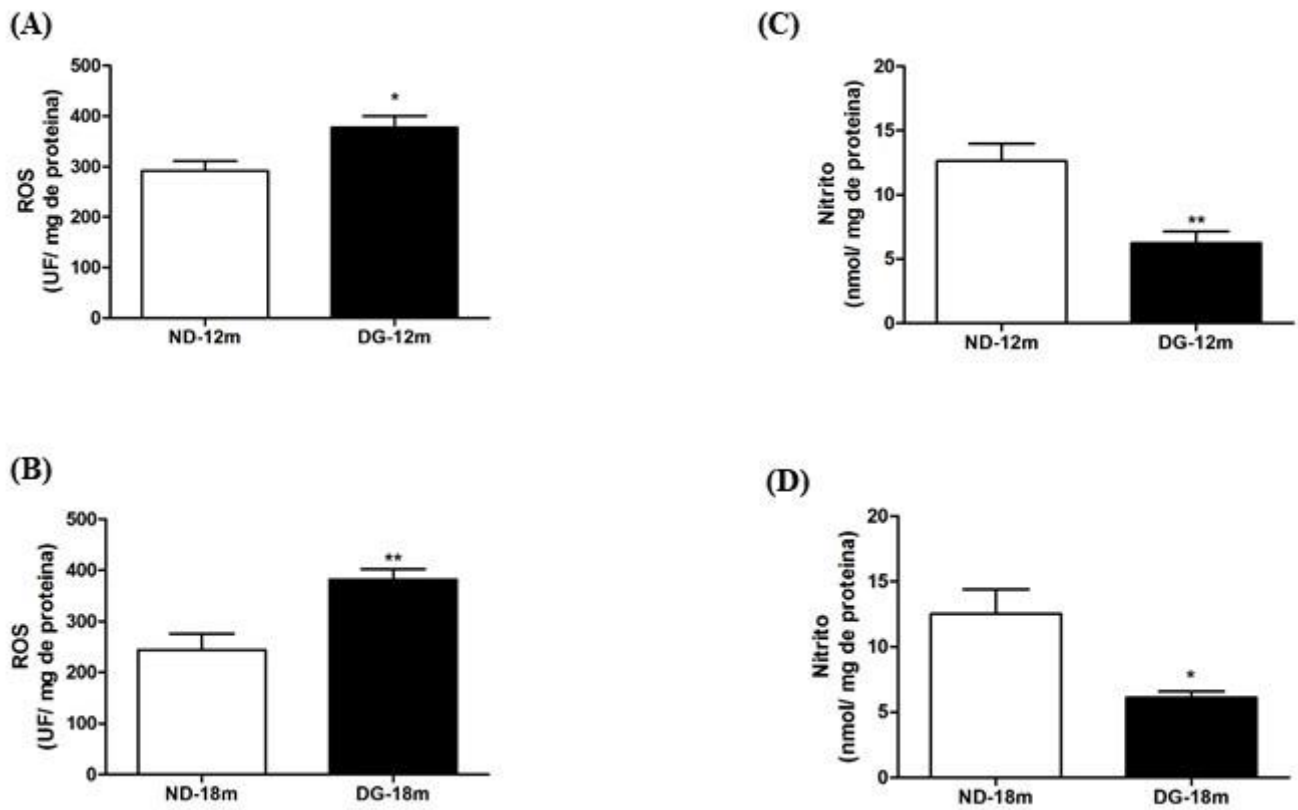
Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $p > 0,05$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

Figura 15 - Atividade da superóxido dismutase e da catalase na aorta das proles aos 3 (A e D), 6 (B e E) e 12 (C e F) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



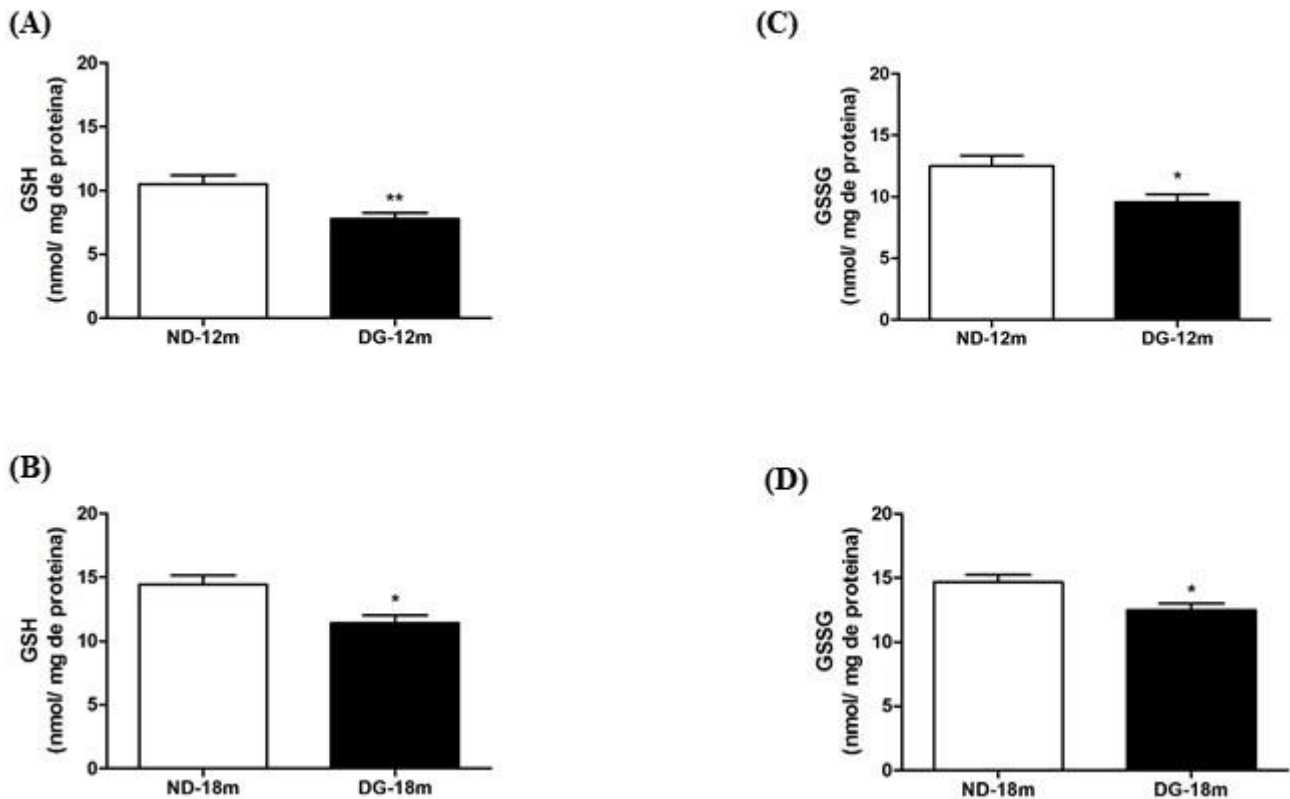
Os valores representam média $\pm$ e.p.m; $p > 0,05$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

Figura 16 - Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitritos no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



Os valores representam média $\pm$ e.p.m.; *p < 0,05; **p < 0,01; Teste t de Student não pareado; n = 5 animais por grupo.

Figura 17 - Concentração de glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparadas aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



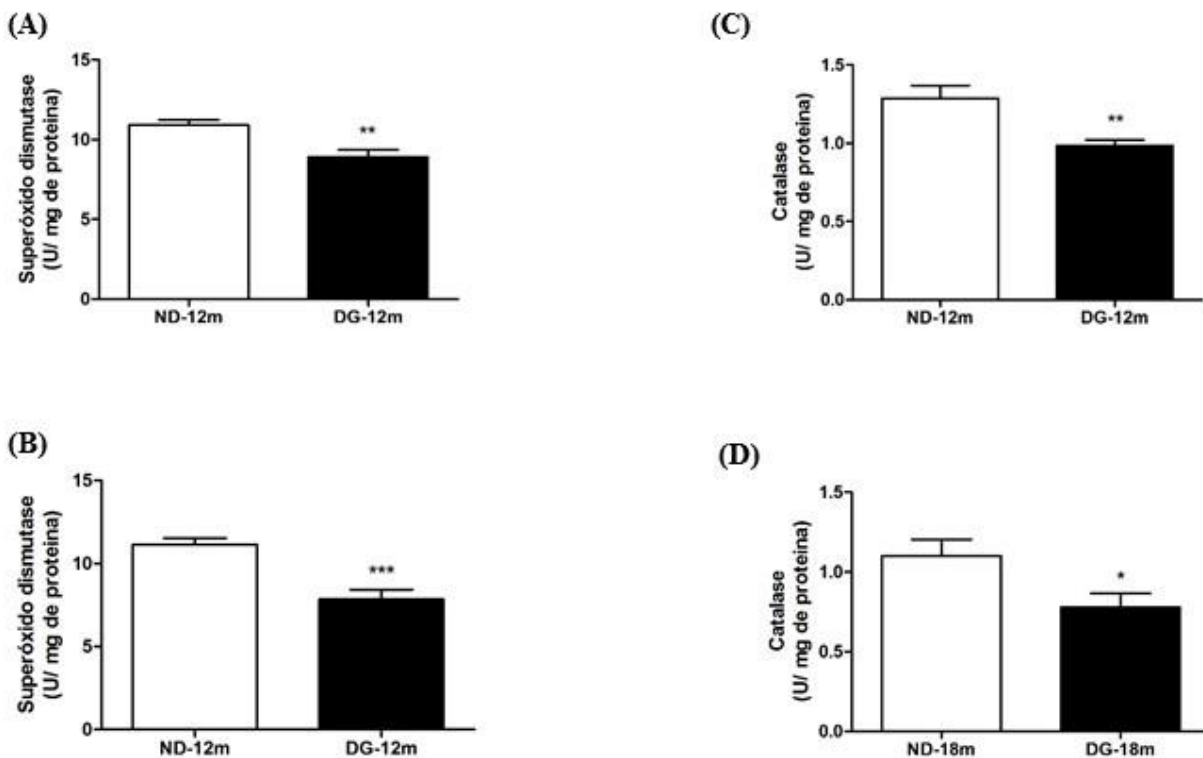
Os valores representam média $\pm$ e.p.m; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

Figura 18 - Razão da glutathiona (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no coração das proles aos 12 (A) e 18 (B) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparados aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).



Os valores representam média $\pm$ e.p.m; * $p < 0,05$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

Figura 19 - Atividade da superóxido dismutase e da catalase no coração das proles aos 12 (A e C) e 18 (B e D) meses de idade expostas ao diabetes gestacional (DG, coluna preta), induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.), comparados aos controles não diabéticos (ND, coluna branca).

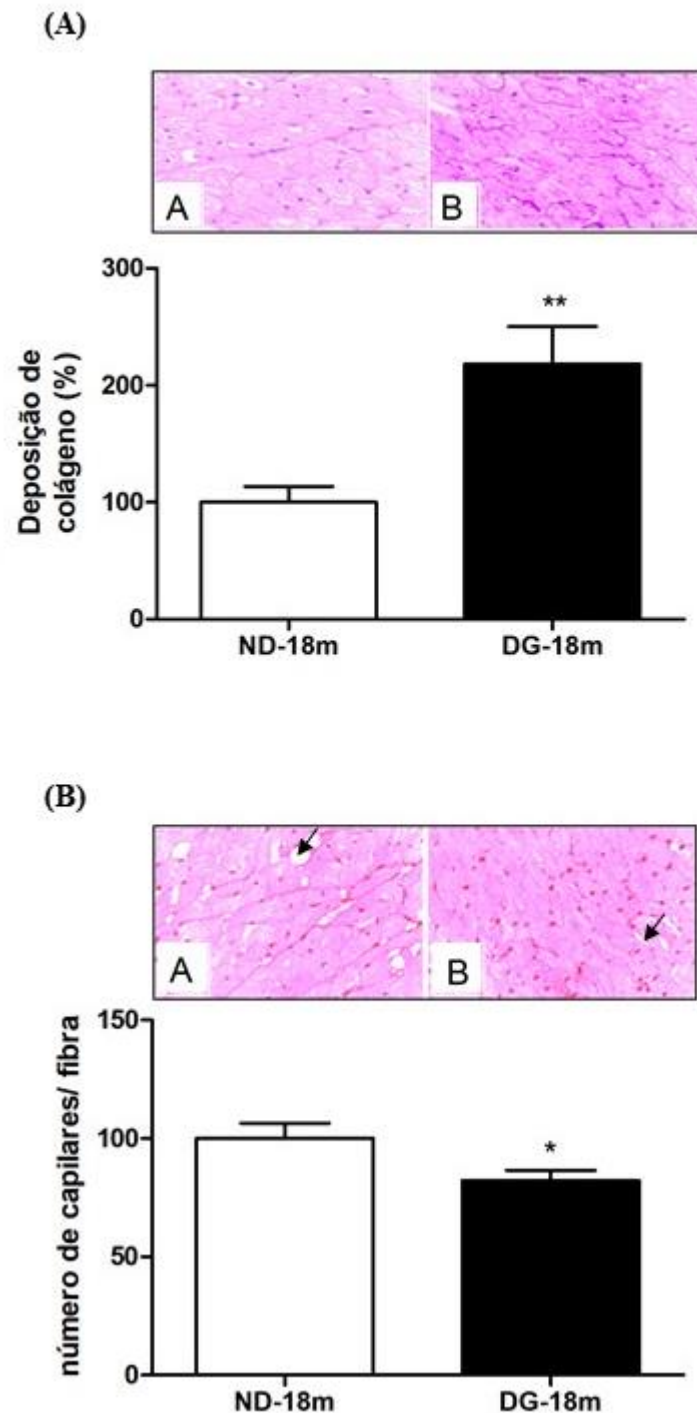


Os valores representam média $\pm$ e.p.m; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo.

5.8 DENSIDADE DOS CAPILARES E FRAÇÃO DE VOLUME DE COLÁGENO NO CORAÇÃO DA PROLE AOS 18 MESES DE IDADE

A fração de volume de colágeno foi 2x maior ($p < 0,01$) na prole DG ($220,0 \pm 32,0$) quando comparada a prole ND ($100,0 \pm 14,0$). Contudo, a prole DG apresentou menor número ($p < 0,05$) de capilares ($82,0 \pm 4,4$) do que a prole ND ($100,0 \pm 6,4$) (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografias de secções de corações da prole aos 18 meses de idade expostas ao diabetes induzido por estreptozotocina (50 mg/kg i.p.) no período intrauterino (DG, coluna preta e imagem B) e de controles não diabéticos (ND, coluna branca e imagem A).



As secções foram coradas pelo Picrosirius red, para avaliação da fração de volume de colágeno (Figura A), por hematoxilina e eosina (H.E.) para avaliação dos números de capilares por fibra (Figura B) e ampliadas 400 x com visualização a luz normal. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste t de Student não pareado; $n = 5$ animais por grupo, 150 campos analisados. Nos cortes corados pela H.E., as setas representam os capilares. Nos cortes corados pelo Picrosirius red, a coloração rosa escuro representa uma maior deposição dos feixes das fibras colágenas no tecido cardíaco.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós investigamos os mecanismos moleculares envolvidos na gênese e/ou manutenção do estresse oxidativo, tais como as vias AGEs-RAGE e NADPH oxidase, em aortas de animais aos 3, 6 e 12 meses e no coração aos 12 e 18 meses de idade expostos ao DG. A prole de ambos os grupos foi avaliada quanto aos parâmetros metabólicos, como tolerância a glicose e sensibilidade a insulina, níveis glicêmicos, perfil lipídico, glicogênio hepático e muscular, bem como análise do estresse oxidativo e a expressão proteica do RAGE e da Nox4 na aorta e no coração da prole nas idades mencionadas.

As proles, aqui estudadas foram expostas ao ambiente hiperglicêmico, do sétimo dia de gestação até o final da lactação. O 7º dia de gestação foi escolhido para a administração de STZ, visto que a injeção antes da concepção ou no início da gestação (entre o 1º e o 5º dia) reduz a probabilidade de prenhez e aumenta as taxas de reabsorção fetal pelo organismo materno (SIVAN et al., 1997). Além disso, a STZ é eliminada do organismo dentro de 24 horas, evitando-se assim o período de organogênese que ocorre do 8º ao 12º dia de gestação em ratos (OLIN, 1990). Dessa forma, ao contrário de outros estudos (ERIKSSON; DAHLSTROM; HELLERSTROM, 1983; ERIKSSON; JANSSON, 1984), nós não evidenciamos filhotes malformados oriundos das mães diabéticas. Entretanto, 10% das gestações com diabetes induzido por STZ não evoluíram até o parto.

É importante ressaltar que, as fêmeas diabéticas também apresentaram sinais clássicos da DM, como hiperglicemia, poliúria, polifagia, polidipsia e perda de peso, que persistiram até o final da lactação. Esta redução do peso corporal pode estar associada ao aumento da degradação muscular de proteínas estruturais, no catabolismo de lipídios e de proteínas (KUMAR et al., 2013).

As proles oriundas de mães diabéticas, nasceram com baixo peso e assim se mantiveram até os 18 meses de idade. Em ratos, essa relação é vinculada aos níveis de glicemia da mãe que, quando severamente diabéticas, podem gerar fetos com baixo peso corporal e/ou malformados (HOLEMANS et al., 1991; EJDESJÖ; WENTZEL; ERIKSSON et al., 2012). Neste trabalho as ratas que originaram as proles DG, apresentaram uma glicemia em jejum ≥ 350 mg/dL. Portanto, os achados de nosso estudo estão de acordo com a literatura e com resultados anteriores da nossa equipe (PORTO et al., 2010; RAMOS-ALVES et al., 2012). É importante ressaltar que, variações no tamanho fetal podem estar relacionadas ao número de fetos por gestação. Entretanto em nosso estudo, observamos que as mães

diabéticas induzidas por STZ apresentaram ninhadas menores quando comparadas as mães controles.

Canavan e Goldspink (1988) demonstraram que a redução do crescimento fetal está associada a uma diminuição da síntese de proteínas fetais. Além disso, alterações na estrutura da placenta também parecem estar envolvidas na restrição do peso ao nascimento, visto que a hiperglicemia pode induzir uma redução da proliferação do trofoblasto e diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário, prejudicando a transferência de metabólitos entre a circulação materna e fetal (ERIKSSON; JANSSON, 1984; GEWOLB et al., 1986; WEISS et al., 2001; JANSSON; POWELL, 2007).

Estudos prévios também observaram a relação entre baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de resistência à insulina e doenças na vida adulta (FORSÉN et al., 2000; OZANNE; HALES, 2000). O retardo no crescimento observado na prole DG até os 18 meses de idade, pode estar vinculado a disfunção das células β pancreáticas e consequentemente a deficiência na secreção de insulina, como pode ser comprovado pelos índices HOMA-IR e HOMA- β , bem como pela menor concentração de insulina plasmática aos 18 meses de idade. As alterações na expressão de componentes chaves da cascata de sinalização da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo ocorrem antes do desenvolvimento do diabetes e representam marcadores de restrição de crescimento e de risco às doenças cardiovasculares.

A hipertrigliceridemia é um excelente marcador da resistência à insulina e é considerada a principal característica da dislipidemia em pacientes diabéticos (MOORADIAN, 2009; SCHOFIELD et al., 2016). Sabe-se que a enzima lipase lipoproteica (LLP) é insulino dependente, dessa forma na ausência de insulina ou devido a resistência à insulina, a atividade da LLP é reduzida resultando em níveis mais altos de quilomícrons e triglicerídeos (AIRES, 2012). O aumento de triglicerídeos indica não apenas uma disfunção metabólica, mas também o aumento da peroxidação lipídica (MYLONAS; KOURETAS, 1999). A hipertrigliceridemia e a intolerância à glicose verificada na prole exposta a hiperglicemia materna, corrobora o conceito de programação fetal e sugere um quadro de pré-diabetes.

Na literatura, há divergências nos parâmetros metabólicos de ratos expostos a hiperglicemia e é possível que essas diferenças sejam consequentes ao uso do anestésico ketamina associado à xilazina utilizados na realização da curva de tolerância a glicose ou da insulina (GUARINO et al., 2013; CARDOSO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010). Tal fato, nos levou a escolher o pentobarbital sódico, no intuito de evitar estresse para o animal, uma

vez que comprovadamente não altera os parâmetros supramencionados (CARDOSO et al., 2005; GUARINO et al., 2013).

A prole DG não apresentou RI em todas as idades avaliadas, o que indica que a captação e utilização periférica da glicose pelos tecidos-alvo está dentro dos padrões de normalidade. Ademais, em nosso estudo foi observado que a prole DG aos 18 meses de idade era hiperglicêmica e apresentava níveis reduzidos de insulina plasmáticos. Juntos esses dados descartam alterações na sensibilidade dos receptores de insulina e sugerem um comprometimento na secreção da insulina provavelmente por alterações estruturais a nível das células β pancreáticas. Contudo, ao utilizar proles Sprague Dawley expostas a hiperglicemia materna que fora induzida com 35 mg/kg de STZ no dia zero da gestação, Blondeau e colaboradores (2011) observaram que aos 6 meses de idade as proles eram intolerantes à glicose, mas apresentavam sensibilidade normal à insulina. Entretanto, na fase adulta mais tardia, aos 12 meses de idade, as proles desenvolveram RI. Estes autores ainda demonstraram que a secreção de insulina e a análise histomorfométrica do tecido pancreático desses animais não foram modificados, sugerindo que a diminuição da resposta à insulina não está relacionada a anormalidades estruturais do pâncreas endócrino e que o diabetes materno não alterou a massa de células β . Vale salientar que o modelo experimental utilizado por Blondeau e colaboradores (2011) foi diferente do nosso, no que diz respeito a linhagem animal, dose e período de indução da DG.

É ainda possível que o diabetes materno altere o desenvolvimento de vários órgãos, como por exemplo fígado, músculo estriado esquelético e tecido adiposo, que eventualmente levarão à disfunção insulínica na fase adulta (PETROPOULOS et al., 2015). As células β -pancreáticas podem secretar inicialmente níveis normais de insulina, todavia níveis glicêmicos elevados induziria como resposta compensatória o aumento da secreção de insulina, levando a exaustão das células β e uma menor sensibilidade dos órgãos periféricos em absorver a glicose adequadamente.

A redução da capacidade de armazenamento de glicogênio hepático, bem como a intolerância à glicose, observada no presente trabalho nas proles adultas expostas a hiperglicemia na fase gestacional, podem estar relacionadas com modificações na concentração de enzimas hepáticas. Alguns autores demonstraram que, animais com diabetes induzido por STZ apresentaram níveis elevados de glicose-6-fosfatase e frutose-1-6-bifosfato, além de redução dos níveis de hexoquinase (LIU et al., 1994; PARI; SARAVANAN, 2004), o que prejudica a capacidade hepática de sintetizar o glicogênio, bem como a conversão e utilização da glicose pelo fígado (ABO-SALEM et al., 2014).

As alterações no metabolismo da glicose e dos lipídeos também podem estar relacionadas as modificações morfofuncionais e ao aumento do estresse oxidativo hepático. Em estudos prévios realizados por nossa equipe, utilizando o mesmo modelo experimental, foi demonstrado que a prole exposta a hiperglicemia aos 6 meses de idade apresentou como parâmetros hepáticos: redução do peso do fígado, aumento do infiltrado de macrófagos, hiperplasia de hepatócitos e redução da densidade de vasos (TEIXEIRA-SILVA, 2015), bem como aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e redução nos níveis de GSH (LIRA et al., 2015). Estes resultados se coadunam com as observações de outros autores, encontradas em ratos diabéticos (BARNEO et al., 1990; DAS et al., 1996; THULESEN et al., 1997; DEGIRMENCHI et al., 2002; ZAFAR et al., 2009). Há uma baixa probabilidade dessas alterações hepáticas na prole serem causadas por efeito direto da STZ, uma vez que o maior desenvolvimento dos hepatócitos em ratos da linhagem Wistar, ocorre entre o 13º e 20º dia de gestação (VASSY et al., 1988). É importante ressaltar que a indução do diabetes em nosso modelo ocorre no 7º dia gestacional e que a STZ apresenta um tempo de meia-vida muito curto, de 5 a 15 minutos (SCHEIN; LOFTUS, 1968; ELEAZU et al., 2013b).

A concentração de glicogênio muscular na prole adulta não foi alterada pela exposição ao DG, e embora o músculo esquelético represente uma das maiores reservas de glicose no organismo, o glicogênio muscular não é disponibilizado para os outros tecidos, pois não possui a enzima glicose 6-fosfatase responsável pela conversão de glicose 6-fosfato em glicose (AIRES, 2012).

A interação AGEs-RAGE, o aumento da produção de ROS derivado da NADPH oxidase e o sistema renina-angiotensina contribuem para a progressão e o desenvolvimento das complicações cardiovasculares no diabetes (BEDDARD; KRAUSE, 2007; GRAY; JANDELEIT-DAHM, 2014). Nossa equipe verificou anteriormente, um aumento dos níveis plasmáticos de AGEs na prole exposta a hiperglicemia materna aos 4 meses (SANTOS, 2011) bem como, um aumento da expressão proteica do RAGE no tecido cardíaco da prole aos 6 meses de idade, quando comparada a prole controle (TEIXEIRA-SILVA, 2015). Em continuidade a esses experimentos, resolvemos avaliar a expressão proteica do RAGE no coração da prole DG aos 12 e aos 18 meses de idade.

No presente estudo houve um aumento significativo da expressão proteica do RAGE no coração da prole DG aos 12 e 18 meses de idade. Este resultado é de grande importância, visto que a expressão do RAGE evidencia a forte relação entre a exposição à hiperglicemia no período gestacional e o desenvolvimento do estresse oxidativo na vida adulta. É importante

destacar que, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que demonstra a expressão proteica do RAGE no coração da prole adulta exposta ao DG. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura também relata o aumento da expressão do RAGE em outros modelos experimentais, como em animais geneticamente modificados (*knockout*) e estudos realizados *in vitro* utilizando células do músculo liso e cultura de cardiomiócitos. Tem-se como exemplo, camundongos diabéticos (induzidos por STZ) *knockout* para RAGE em órgãos que expressam apolipoproteína E - apoE (SORO-PAAVONEN et al., 2008), camundongos *knockout* global par apoE (BUCCIARELLI et al., 2002), ratos Wistar diabéticos induzidos por STZ (30mg/ kg, i.p.) alimentados com dieta hiperlipídica, tratados com pioglitazona e isoproterenol (KHODEER et al., 2016), ratos Long Evans diabéticos induzidos por STZ (KANG et al., 2016), ratos Sprague-Dawley com diabetes induzido por STZ e alimentados com dieta hiperlipídica (HOU et al., 2016). Ademais, Bucciarelli e colaboradores (2008) mostraram que a isquemia-reperfusão cardíaca levou ao aumento da expressão proteica de RAGE em ratos BioBred, um modelo de DM1. Em outro estudo, Tsoporis e colaboradores (2010) induziram infarto do miocárdio em ratos Sprague-Dawley, resultando no aumento da expressão de RAGE em cardiomiócitos e apoptose de miócitos.

Contudo, estudos que referenciam o aumento da expressão do RAGE na prole são escassos. Chandna e colaboradores (2015) observaram que o aumento na expressão proteica do RAGE alterou o desenvolvimento normal do hipocampo e o comportamento da prole de ratas diabéticas induzidas por STZ. Já em pacientes diabéticos o aumento de RAGE está associado com a aterosclerose e o infarto do miocárdio (CIPOLLONE et al., 2003; FALCONE et al., 2013; YAMAGISHI; NAKAMURA; MATSUI, 2017). No entanto, não foram encontrados artigos que demonstrem a expressão proteica de RAGE no sistema cardiovascular em proles de mães diabéticas nas idades estudadas.

Existem evidências que as ROS produzidas pela NADPH oxidase (Nox) parecem ser uma via comum para as alterações hemodinâmicas e metabólicas observadas no diabetes (SHEN, 2010). Em nosso estudo, a expressão proteica da Nox4, encontra-se elevada no coração da prole DG aos 12 e 18 meses em comparação a prole ND. Contudo, o papel da Nox4 no desenvolvimento das complicações cardiovasculares ainda é controverso. Estudos com diversos modelos experimentais demonstraram que o aumento da expressão proteica da Nox4 no coração, pode estar associado ao aumento da produção de ROS, apoptose e diferenciação de cardiomiócitos, disfunção mitocondrial, fibrose, hipertrofia cardíaca e comprometimento da contratilidade (KURODA et al., 2010; ZHAO et al., 2015; MATSUSHIMA et al., 2013; GUO et al., 2014). Em animais diabéticos induzidos por STZ, a

Nox4 também está aumentada no coração de hamsters (MAEDA et al., 2012); ratos Sprague-Dawley (GUO et al., 2014) e camundongos transgênicos que superexpressam Myc-1, proteína envolvida no ciclo celular (THANDAVARAYAN et al., 2011). Em outros modelos de programação fetal a expressão proteica da Nox4 também se apresentou elevada, como por exemplo na prole submetida a inflamação materna oriundas de ratas Sprague-Dawley tratadas com lipolissacarídeos (LPS) (ZHANG et al., 2016) e em artérias mesentéricas da prole de ratas Sprague-Dawley submetidas a dieta pré-natal com alto teor de sacarose (FENG et al., 2017).

Os efeitos da sinalização dependente da Nox4 parecem estar associados ao tipo de tecido/ célula ou estágio de desenvolvimento da lesão. No presente estudo, a expressão proteica e gênica da Nox4 (dados não mostrados) na aorta não diferiu entre os grupos DG e ND. Contudo, a expressão e a função da Nox4 no tecido vascular são controversas (FULTON; BARMAN, 2016), mas alguns autores sugerem a participação da Nox4 na patogênese vascular e na aterosclerose diabética (GORIN; BLOCK, 2013). Wendt e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão proteica de Nox4 não está aumentada na aorta de animais diabéticos tipo 1 induzidos por STZ, enquanto que Xi e colaboradores (2012) observaram um aumento da Nox4 em células do músculo liso da aorta de camundongos diabéticos induzidos por STZ. A expressão proteica (HWANG et al., 2007; TIAN et al., 2011) e gênica (SAN MARTIN et al., 2007) da Nox4 também se encontram aumentadas em aortas de camundongos diabéticos db/ db, bem como no músculo liso de ratos Zucker (TONG et al., 2010), estando relacionada a um aumento do estresse oxidativo e a disfunção endotelial.

É possível que a variação na expressão e localização da Nox4 possa ser influenciada por fatores como, diferentes modelos experimentais, tipos de leitos vasculares estudados, pressão no interior do vaso, bem como a presença de fatores de crescimento, vasoativos e inflamatórios (CHEN et al., 2012). Uma vez que a aorta não contribui para a resistência periférica, é provável que uma vasoproteção não ocorra em outros leitos vasculares, como nos vasos de resistência (mesentéricas), onde substâncias vasodilatadoras desempenham funções importantes e a proporção de endotélio em relação a células do músculo liso é maior (SCHRÖDER et al., 2012). Alguns autores também acreditam na função vasoprotetora da Nox4, uma vez que ela preserva a expressão da eNOS, promove a angiogênese, melhora a função endotelial e reduz a inflamação (CRAIGE et al., 2011; SCHRÖDER et al., 2012). Estes efeitos são consistentes com os estudos de Gray e colaboradores (2016) e Craige e colaboradores (2015) que destacam o papel protetor da Nox4 na aterosclerose.

No presente estudo demonstramos ainda o aumento da expressão proteica do RAGE e da Nox4 no coração da prole DG aos 12 e 18 meses. É possível que o aumento da expressão proteica do RAGE e Nox4 no coração da prole DG esteja associado a ativação do NF- κ B, os quais resultam de um aumento na produção das ROS, contribuindo para uma possível redução nos níveis de óxido nítrico, diminuindo a capacidade de defesa antioxidante (BASTA et al., 2002; SEYMOUR et al., 2010). É importante destacar que, a geração das ROS via NADPH oxidase ativa várias vias de sinalização incluindo o próprio NF- κ B, a proteína quinase C (PKC), o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF-B1) e a fibronectina (SEDEEK et al., 2012). Na prole de diversos modelos experimentais, a via do NF- κ B está associada ao desenvolvimento da hipertensão, do diabetes, da aterosclerose aórtica, da esquizofrenia, da fibrose do miocárdio, na odontogênese e na morfogênese renal (CANALE et al., 2011; SONG et al., 2009; KOENERS et al., 2016; DENG et al., 2016; CHEN et al., 2017). Contudo, não houve diferença na expressão gênica e proteica (dados não mostrados) do NF- κ B e do I κ B, seu inibidor específico que o mantém inativo no citoplasma, na aorta da prole DG aos 3 e 6 meses, o que não deve ser excluído a existência de outros níveis de regulação neste tecido ou de diferentes etapas pós-transcricionais.

Os níveis dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) são considerados marcadores confiáveis para estimar o grau de modificações oxidativas das proteínas (WEI et al., 2009). Em resultados anteriores do nosso grupo, observamos que os níveis de AOPP estão significativamente aumentados na prole submetida ao DG aos 4 meses de idade, favorecendo o aumento do estresse oxidativo e o desenvolvimento de DCV (SANTOS, 2011). Utilizando o mesmo modelo experimental, Teixeira-Silva (2015) demonstrou que a prole aos 6 meses de idade, exposta ao diabetes materno apresentou níveis aumentados das ROS no tecido cardíaco, bem como níveis reduzidos das enzimas antioxidantes. Em continuidade aos experimentos de Teixeira-Silva (2015), avaliamos os marcadores do estresse oxidativo cardíaco na prole aos 12 e 18 meses de idade e observamos uma redução significativa da atividade da SOD, CAT e dos níveis de GSH e GSSG, acompanhada pelo aumento dos níveis das ROS e redução dos níveis nitritos, confirmando a existência de um estado pró-oxidativo tecidual.

Evidências experimentais e clínicas demonstram que o acúmulo das ROS está associado ao diabetes ou a obesidade (DONG et al., 2016; CHATTOPADHYAY et al., 2015). Uma possível explicação para a redução da atividade ou expressão da SOD e CAT, seria a inativação ou glicação dessas enzimas (YAN; HARDING, 1997) ou ainda o acúmulo excessivo do radical superóxido e do H₂O₂, que podem produzir OH, principal responsável

pela peroxidação lipídica das membranas celulares (PERCARIO, 2010; BARBOSA et al., 2010; MOHAMADIN et al., 2007). Ademais, o aumento na produção de H_2O_2 pode inativar a SOD, assim como uma maior geração de radicais superóxido também pode ser responsável pela diminuição nas atividades da CAT e da GPx (SHARPE et al., 1998; KESAVULU et al., 2000; KONO; FRIDOVICH, 1982). Em relação a redução dos níveis de glutatona, esta pode estar relacionada com a diminuição da síntese ou da regeneração e/ou aumento da peroxidação lipídica como observado por Raza e John (2004) no pâncreas de ratos diabéticos e no fígado, rim, cérebro e pele de neonatos de mães diabéticas induzidas por STZ (60mg/kg).

Estudos prévios também relataram redução da atividade da SOD, CAT e GSH, e estabelecimento do estresse oxidativo no fígado, rim e coração de ratos diabéticos induzidos por STZ (KALEEM et al., 2006; YU et al., 2015; ABO-SALEM et al., 2015; AL-NUMAIR et al., 2015). Na prole de animais diabéticos induzidos por STZ, Forsberg e colaboradores (1996), Sivan e colaboradores (1997) e em culturas de células embrionárias expostas a hiperglicemia, Ornoy e colaboradores (1999), demonstraram que a atividade da CAT e da SOD estavam reduzidas e relacionadas com anomalias congênitas. Kinalski e colaboradores (2000) observaram que os níveis de GSH e a atividade da SOD apresentaram-se reduzidos no pulmão e no fígado de neonatos de fêmeas diabéticas induzidas por STZ. Redução na expressão e atividade dessas enzimas também foram observadas em filhos de pacientes diabéticos tipo 2 (LE BLANC et al., 2012), bem como na prole de outros modelos experimentais, incluindo a desnutrição materna (STONE et al., 2016), a exposição pré-natal a LPS maternos (AL-AMIN et al., 2016), a dieta de cafeteria (BOUANANE et al., 2009) e a dieta hiperlipídica (ZHANG et al., 2011).

Alguns estudos são controversos em relação à atividade das enzimas antioxidantes em animais diabéticos induzidos por STZ e sua prole, podendo estar aumentada ou até mesmo não apresentar diferenças (SOSENKO; FRANK, 1986; NADERI et al., 2015; CAMARGO et al., 2017). A variabilidade dos resultados, descritos na literatura, pode ser explicada pela linhagem dos animais utilizados, valores da hiperglicemia, duração do experimento, protocolo e tecido utilizados, bem como do tipo, localização, concentração e natureza das espécies reativas geradas.

O aumento do estresse oxidativo cardíaco pode conduzir a uma disfunção contrátil, aumentando o risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (BELL, 2003; POLYAKOVA et al., 2004). As ROS modulam o remodelamento da matriz extracelular e a função de fibroblastos cardíacos, estimulando o colágeno e também a ativação das metaloproteinases da matriz, bem como a formação de citocinas (SIWIK; PAGANO;

COLUCCI, 2001). A primeira evidência da relação entre o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética e o estresse oxidativo foi fornecida por Li e colaboradores (1995). Neste estudo os autores demonstraram que a deleção gênica da Mn-SOD, causou a cardiomiopatia dilatada e a fibrose cardíaca em camundongos *knockout*. Reinking e colaboradores (2009) demonstraram que animais oriundos de ratas diabéticas induzidas por STZ, apresentaram cardiomiopatia hipertrófica, similar à encontrada em humanos, filhos de mães diabéticas (FRUSTACI et al., 2000).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, observamos que a prole aos 4 meses de idade, exposta a hiperglicemia materna apresentou um aumento de 15,7% na relação peso dos ventrículos secos / peso corporal e um aumento de 22,44% na fração de volume de colágeno, com redução na densidade de cardiomiócitos, comprovando a presença de hipertrofia e fibrose cardíaca, comum no processo de reparação tecidual (OLIVEIRA, 2014). Aos 18 meses, Da Silva (2015) observou que a hipertrofia cardíaca na prole exposta a hiperglicemia materna não só persiste na vida pós-natal, mas também aumenta com a idade.

Estudos em animais diabéticos também demonstraram que a idade pode ser um fator contribuinte e até mesmo determinante para as alterações cardíacas (CLAUSEN, 1963; WEZÁR, 1964; MEDUGORAC, 1982; DOLBER; SPACH, 1987; BURGESS, 2001; DEBESSA et al., 2001. Nesse contexto, avaliamos a presença de fibrose cardíaca e rarefação capilar na prole DG aos 18 meses de idade, visto que o envelhecimento está relacionado com o aumento da rigidez e da fibrose, redução da contratilidade, aumento das ROS e disfunção endotelial (KNOWLTON; LEE, 2012).

Os dados histológicos do presente estudo revelaram uma grande deposição de colágeno (2x maior) no coração da prole DG, quando comparada a ND. Sabe-se que em resposta à hiperglicemia, a fibronectina e o colágeno acumulam-se no tecido cardíaco. Este aumento da matriz extracelular (ECM) parece ser mediado pelo fator de crescimento transformante beta-1 (TGF β -1) (MAUER; STEFFES; BROWN, 1981). Além disso, é bem conhecido que, alterações na proporção, tipo e diâmetro das fibras colágenas acarretam em efeitos nas propriedades mecânicas do coração (BROWER et al., 2006), aumentando o risco de arritmias ventriculares, disfunção ventricular esquerda e morte súbita (GONZÁLEZ-SANTAMARIA et al., 2015). De fato, nossa equipe demonstrou que aos 4 (OLIVEIRA, 2014), 12 e 18 (DA SILVA, 2015) meses de idade, as proles expostas a hiperglicemia materna apresentaram um comprometimento da resposta β -adrenérgica em preparações de coração isolado, acompanhado de um aumento da pressão sistólica ventricular esquerda e frequência cardíaca.

Quanto a rarefação capilar encontrada na prole DG aos 18 meses de idade, esta pode ser uma consequência do agravamento do quadro de hiperglicemia que prejudica a perfusão cardíaca e agrava a disfunção do miocárdio. Uma vez que a função mais importante dos capilares é a troca de nutrientes e produtos metabólicos entre o sangue e o tecido intersticial (HINKEL et al., 2017). Nesse contexto, as células endoteliais secretam mediadores, como o óxido nítrico e endotelinas, que modulam as atividades do sistema cardiovascular. Logo, a estrutura dos capilares permite atender rapidamente a demanda do miocárdio às modificações biológicas locais (CINES et al., 1998). Segundo alguns autores, a rarefação de capilares seguida de disfunção endotelial representa um dos mecanismos envolvidos na insuficiência cardíaca (OKRUHLICOVA et al., 2005; HAN et al., 2009).

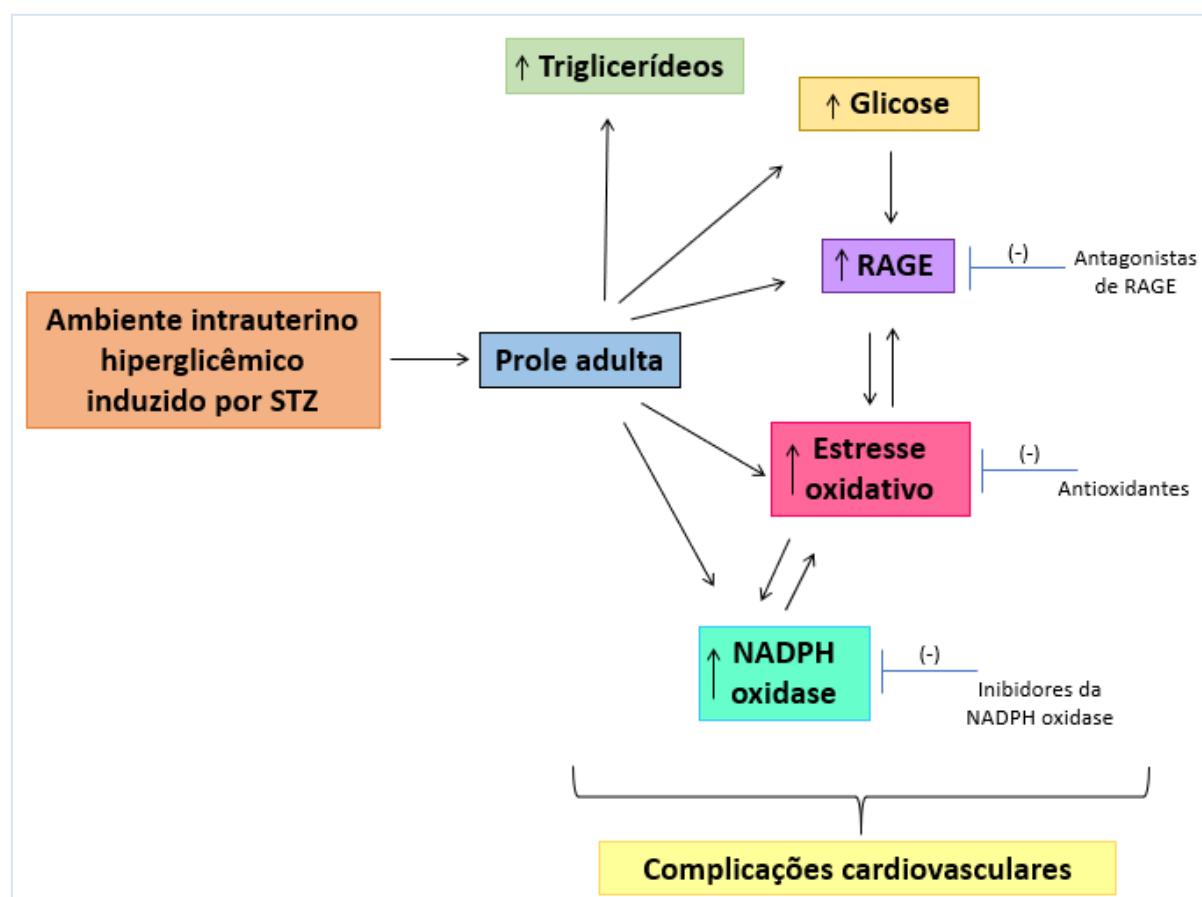
Há também evidências na literatura que a rarefação capilar induzida pelo estresse oxidativo constitui um importante fator de risco para a calcificação vascular através da modulação do RAGE (TOWLER, 2011; WANG et al., 2016). Além disso, o aumento das ROS e a redução na biodisponibilidade do NO são considerados os principais fatores responsáveis pela rarefação capilar no diabetes, bem como na hipertensão (FRISBEE, 2005b; KOBAYASHI; DELANO; SCHMID, 2005). Dessa forma, é importante ressaltar que, a rarefação capilar evidenciada na prole DG aos 18 meses de idade, foi acompanhada por elevação dos níveis de glicose plasmáticos, menores níveis de insulina bem como aumento do estresse oxidativo cardíaco e da expressão proteica do RAGE.

No nosso trabalho obtivemos informações complementares, visto que como previamente relatado por nossa equipe, as proles oriundas de mães com DG desenvolveram hipertensão arterial a partir dos 6 meses de idade (RAMOS-ALVES et al., 2012) e continuaram hipertensas aos 12 e 18 meses (DA SILVA, 2015). Anormalidades vasculares podem estar envolvidas na hipertensão observada neste modelo, em publicações do nosso grupo foi observado um aumento na produção de prostanóides derivados da COX-2 na prole de mães diabéticas, especialmente de tromboxano A₂ (TxA₂), prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), o que reduziu o relaxamento dependente do endotélio e aumentou a capacidade de resposta noradrenérgica em AMR (RAMOS-ALVES et al., 2012a,b). Rocha e colaboradores (2005) e Nehiri e colaboradores (2008) também demonstraram um aumento da pressão arterial na prole de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina aos 12 e 6 meses de idade, respectivamente.

Juntos, nossos resultados mostram que a exposição, durante a gestação a níveis elevados de glicemia, programa o metabolismo glicêmico e lipídico, com participação do RAGE e do desequilíbrio redox no tecido cardíaco da prole na idade adulta. A hiperglicemia

aumenta a expressão proteica de RAGE, conduzindo a uma maior formação das ROS, que atuam retroalimentando a ativação de RAGE, uma vez que o aumento das ROS, derivadas da NADPH oxidase, também pode aumentar a expressão de RAGE. Nesse contexto, a inibição do estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos moleculares pelo qual antioxidantes e antagonistas de RAGE bem como, inibidores da NADPH oxidase, poderiam constituir um potencial alvo terapêutico para a prevenção e tratamento das complicações metabólicas e cardiovasculares do diabetes, como a cardiomiopatia diabética (Figura 21). Contudo, os dados do presente trabalho ainda são limitados para explicar os efeitos do diabetes gestacional sobre a prole. Dessa forma, estudos futuros envolvendo a participação das outras isoformas da NADPH oxidase, do NF- κ B, bem como do sistema renina-angiotensina, são necessários na tentativa de fundamentar os nossos resultados e melhorar o nosso conhecimento sobre os mecanismos que relacionam a hiperglicemia materna e suas consequências sobre prole.

Figura 21 – Desenho esquemático destacando o papel da glicose no aumento de RAGE, bem como no aumento do estresse oxidativo derivado da NADPH oxidase para o desenvolvimento das complicações cardiovasculares na prole de animais diabéticos.



Fonte: A autora (2017).

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; JUSZCZYK, D.; VAN JAARSVELD, C.H.M.; GULLIFORD, M. Body Mass Index and Incident Type 1 and Type 2 Diabetes in Children and Young Adults: A Retrospective Cohort Study. **J Endocr Soc**, v. 1, n. 5, p. 524-37, 2017,
- ABELOVE, W. A.; PASCHIKS, K. E. Comparison of the diabetogenic action of cortisone and growth hormone in different species. **Endocrinology**, v. 55, p. 637-640, 1954.
- ABO-SALEM, O.M.; HARISA, G.I.; ALI, T.M.; EL-SAYED, E-S.M.; ABOU-ELNOUR, F.M. Curcumin ameliorates streptozotocin-induced heart injury in rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 28, p. 263-70, 2014.
- ADA, (American Diabetes Association). Classification and diagnosis of diabetes. Sec 2., Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, 38 (Suppl. 1), p. S8-S16, 2016.
- ADA, (American Diabetes Association). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 131-6, 1984.
- AERTS, L.; ASSCHE, F. A. V. Is gestacional diabetes an acquired conditions? **J Devel Biol**, v.1, p. 219-225, 1979.
- AERTS, L.; HOLEMANS, K.; VAN ASSCHE, F. A. Impaired insulin response and action in offspring of severely diabetes rats. **Frontiers in Diabetes Research. Lessons from Animal Diabetes III**, 1990.
- AERTS, L.; SODOYEZ-GOFFAUX, F.; SODOYEZ, J.C.; MALAISSE, W.J.; VAN ASSCHE, F.A. The diabetic intrauterine milieu has a long-lasting effect on insulin secretion by B cells and on insulin uptake by target tissues. **Am J Obstet Gynecol**, v. 159, p. 1287-92, 1988.
- AGO, T.; KITAZONO, T.; OOBOSHI, H.; IYAMA, T.; HAN Y.H.; TAKADA, J.; WAKISAKA, M.; IBAYASHI, S.; UTSUMI, H, LIDA, M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 227–233, 2004.
- AGO, T.; KURODA, J.; PAIN, J.; FU, C.; LI, H.; SADOSHIMA, J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. **Circ Res**, v. 106, p. 1253–64, 2010.
- AIRES, M.M. **Fisiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- AKHTAR, M.S.; PILLAI, K.K.; HASSAN, Q.; ANSARI, S.H.; ALI, J.; AKHTAR, M.; NAJMI, K. Levosimendan suppresses oxidative injury, apoptotic signaling and mitochondrial degeneration in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. **Clin Exp Hypertens**, v. 38, p. 10–22, 2016.

AL-AMIN, M.M.; SULTANA, R.; SULTANA, S.; RAHMAN, M.M.; REZA, H.M. Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. **BMC Neurosci**, v. 17, p. 1-10, 2016.

ALCOLADO, J.C.; LAJI, K.; GILL-RANDALL, R. Maternal transmission of diabetes, **Diabet Med**, v. 19, n. 2, p. 89-98, 2002.

ANDERSEN, A. R.; CHRISTIANSEN, J.S.; ANDERSEN, J.K.; KREINER, S.; DECKERT, T. Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. **Diabetologia**, v. 25, n. 6, p. 496–501, 1983.

ANNA, V.; VANN DER PLOEG, H.P.; CHEUNG, N.W.; HUXLEY, R.R.; BAUMAN, A.E. Socio-demographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005. **Diabetes Care**, v. 31, n. 12, p. 2288–2293, 2008.

ANTONIADES, C.; TENTOLOURIS, C.; TOUTOUZAS, P.; STEFANADIS, C. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. **Herz**, v.28, p. 628-638, 2003.

ARIAS-DÍAZ, J.; BALIBREA, J. Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes. **Nutr Hosp**, v. 22, n. 2, p. 160-8, 2007.

ASHOFF, A.; QADRI, F.; EGGERS, R.; JOHREN, O.; RAASCH, W.; DENDORFER, A. Pioglitazone prevents capillary rarefaction in streptozotocin-diabetic rats independently of glucose control and vascular endothelial growth factor expression. **J Vasc Res**, v. 49, p. 260-6, 2012.

AXLER, D.A. Stability of the diabetogenic activity of streptozotocin. **IRCS Medical Science**, v. 10, n. 2, p. 157-158, 1982.

BAEUERLE, P. A. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. **Biochim Biophys Acta**, v. 1072, n. 1, p. 63–80, 1991.

BANSAL, V.; KALITA, J.; MISRA, U.K. Diabetic neuropathy. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 964, p. 95-100, 2006.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v. 23, n.4, p.629-643, 2010.

BARKER, D.J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, n. 5, p. 412-7, 2007.

BARKER, D.J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, v. 311, p. 171-4, 1995.

BARKER, D.J.; WINTER, P.D.; OSMOND, C.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v. 9, n. 2, p. 577-80, 1989b.

BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M.E. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, p. 564-567, 1989a.

BARNEO, L.; ESTEBAN, M.M.; GRACIA-PRAVIA, C.; DIAZ, F.; MARIN, B. Normalization of altered liver function tests after islet transplantation in diabetic rats. **Diabetes Metab**, v. 16, n. 4, p. 284-289, 1990.

BARNETT, P.A.; GONZALEZ, R.G.; CHYLACK, L.T.; CHENG, H.M. The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. **Diabetes**, v. 35, p. 426-432, 1986.

BASTA, G.; LAZZERINI, G.; MASSARO, M.; SIMONCINI, T.; TANGANELLI, P.; FU, C. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. **Circulation**, v. 105, p. 816-22, 2002.

BASUROY, S.; BHATTACHARYA, S.; LEFFLER, C.W.; PARFENOVA, H. Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, n. 3, p. C422-32, 2009.

BAYNES, J.W. The Maillard hypothesis on aging: time to focus on DNA. **Ann NY Acad Sci**, v. 959, n.3, p. 60-67, 2002.

BEDARD K.; KRAUSE K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, p. 245-313, 2007.

BELL, D.S.H. Functional class in patients with heart failure is associated with the development of diabetes. **Am J Med**, v. 115, p. 412-418, 2003.

BIERHAUS, A.; ILLMER, T.; KASPER, M.; LUTHER, T.; QUEHENBERGER, P.; TRITSHLER, H.; WAHL, P.; ZIEGLER, R. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. **Circulation**, v. 96, n. 7, p. 2262-2271, 1997.

BIHOREAU, M.T.; KTORZA, A.; KINEBANYAN, M.F.; PICON, L. Impaired glucose homeostasis in adult rats from hyperglycemic mothers. **Diabetes**, v. 35, p. 979-84, 1986.

BIRDEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BLONDEAU, B.; JOLY, B.; PERRET, C.; PRINCE, S.; BRUNEVAL, P.; LELIÈVRE-PÉRGORIER, M.; FASSOT, C.; DUONG VAN HUYEN, J.P. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. **Diabetes Metab**, v. 37, n. 3, p. 245-51, 2011.

BLONDEAU, B.; BREANT, B. Effect of nutrition on fetal development: a view on the pancreatic beta-cells. In: Djelmis J, Desoye G, Ivanisevic M, editors. **Diabetology of pregnancy**. Basel: Karger, 2005.

BLOOMGARDEN, Z. T. Topics in cardiovascular disease and diabetes. **Diabetes Care** United States, v. 20, n. 10, p. 1624-1627, 1997.

BONGARZONE, S.; SAVICKAS, V.; LUZI, F.; GEE, A.D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. **J Med Chem**, v. 19, p. 1-17, 2017.

BONORA, E.; MANICARDI, V.; ZAVARONI, I.; COSCELLI, C.; BUTTURINI, U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. **Diabete Metab**, v. 13, n. 2, p. 116-21, 1987.

BOROUJENI, N.B.; HASHEMI, S.M.; KHAKI, Z.; SOLEIMANI, M. The reversal of hyperglycemia after transplantation of mouse embryonic stem cells induced into early hepatocyte-like cells in streptozotocin-induced diabetic mice. **Tissue Cell**, v. 43, p.75–82, 2011.

BOUANANE, S.; BENKALFAT, N.B.; BABA AHMED, F-Z.; MERZOUK, H.; MOKHTARI, N.S.; MERZOUK, S-A. Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, p. 669–80, 2009.

BOYER, S.; SHARP, P.A.; DEBNAM, E.S.; BALDWIN, S.A.; SRAI, S.K. Streptozotocin diabetes and the expression of GLUT1 at the brush border and basolateral membranes of intestinal enterocytes. **FEBS Lett**, v. 396, p. 218–222, 1996.

BOULTON, A. J. M.; VINIK, A.L.; AREZZO, J.C.; BRIL, V.; FELDMAN, E.L.; FREEMAN, R.; MALIK, R.A.; MASER, R.E. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, p. 956–962, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Ministério da Saúde**, 2006.

BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, v. 272, n. 5262, p. 685–688, 1996.

BRETT, J.; SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; ZOU, Y.S.; WEIDMAN, E.; PINSKY, D. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **Am J Pathol**, v. 143, p. 1699–712, 1993.

BRITO, P.L.; FIORETTO, P.; DRUMMOND, K.; KIM, Y.; STEFFES, M.W.; BASGEN, J.M. Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. **Kidney Int**, v. 53, p. 754-61, 1998.

BROWER, G.L.; GARDNER, J.D.; FORMAN, M.F.; MURRAY, D.B.; VOLOSHENYUK, T.; LEVICK, S.P. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 30, n. 4, p. 604-10, 2006.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes United States**, p. 1615-25, 2005.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLISSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N Engl J Med**, v. 318, n. 20, p. 1315–1321, 1988.

BRUCE, C.; TALL, A.R. Cholesteryl ester transfer proteins, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 6, p. 306-11, 1995.

BUCCIARELLI, L. G.; WENDT, T.; QU, W.; LU, Y.; LALLA E.; RONG, L.L.; GOOVA, M.T. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. **Circulation**, v. 106, n. 22, p. 2827–2835, 2002.

BUCCIARELLI, L.G.; ANANTHAKRISHNAN, R.; HWANG, Y.C.; KANEKO, M.; SONG, F.; SELL, D.R. RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. **Diabetes**, v. 57, p. 1941–51, 2008.

BURGUESS, M.L.; MCCREA, J.C.; HEATHER, L.H. Age-associated changes in cardiac matrix and integrins. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 15, p. 1739-1756, 2001.

BURLINA, S.; DALFRÀ, M.G.; CHILELLI, N.C.; LAPOLLA, A. Gestational Diabetes Mellitus and Future Cardiovascular Risk: An Update. **Int J Endocrinol**, v. 2016, p. 1-6, 2016.

BUTLER, A.E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R.A.; BUTLER, P.C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 102-10, 2003.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovas Res.**, v. 68, p. 26-36; 2005.

CAI, L.; INNIS, R.B.; PIKE, V.W. Radioligand development for PET imaging of beta-amyloid (A β) – Current status. **Curr Med Chem**, v. 14, p. 19-52, 2007.

CALDERARI, S.; GANGNERAU, M.N.; THIBAUT, M.; MEILE, M.J.; KASSIS, N.; ALVAREZ, C.; PORTHA, B.; SERRADAS, P. Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 7, p. 1463–1471, 2007.

CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M.V.C.; RAMOS, M.D.; PERAÇOLI, J.C. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas – relação com a macrosomia e o retardo do crescimento intra-uterino. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.21, p. 1256-7, 1999.

CALUWAERTS, S.; HOLEMANS, K.; VAN BREE, R.; VERHAEGHE, J.; VAN ASSCHE, F.A. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes Mellitus? **J Soc Gynecol Investig**, v. 10, n. 4, p. 216-21, 2003.

CAMARGO, A.C.L.; DOS SANTOS, S.A.A.; RINALDI, J.C.; CONSTANTINO, F.B.; COLOMBELLI, K.T.; SCARANO, W.R. Streptozotocin-Induced Maternal Hyperglycemia

Increases the Expression of Antioxidant Enzymes and Mast Cell Number in Offspring Rat Ventral Prostate. **Anat Rec**, v. 300, p. 291-9, 2017.

CAMPISANO, S.E.; ECHARTE, S.M.; PODAZA, E.; CHISARI, A.N. Protein malnutrition during fetal programming induces fatty liver in adult male offspring rats. **J Physiol Biochem**, v. 73, n. 2, p. 275-285, 2017.

CANALE, D.; RODRIGUES, M.V.; FERREIRA, D.N.; MACHADO, F.G.; VERAS, M.M.; MALHEIROS, D.M.A.C. Programmed hypertension in rats treated with a NF-kappaB inhibitor during nephrogenesis: renal mechanisms. **Hypertens Res**, v. 34, p. 693-700, 2011.

CANAVAN, J.P.; GOLDSPIK, D.F. Maternal diabetes in rats. II. Effects on fetal growth and protein turnover. **Diabetes**, v. 37, p. 1671-1677, 1988.

CANDELA, S.; HERNANDEZ, R.E.; GAGLIARDINO, J.J. Circadian variation of the streptozotocin-diabetogenic effect in mice. **Experientia**, v. 35, p. 1256-7, n. 9, 1979.

CARDOSO, A.R.; CARVALHO, C.R.; VELLOSO, L.A.; BRENELLI, S.L.; SAAD, M.J.; CARVALHEIRA, J.B. Effect of thiopental, pentobarbital and diethyl ether on early steps of insulin action in liver and muscle of the intact rat. **Life Sci**, v. 76, n. 20, p. 2287-97, 2005.

CARROL, N.V.; LONGLEY, R.W.; ROE, J.H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J Biol Chem**, v. 220, n. 2, p. 583-93, 1956.

CAVANAL, M. F.; GOMES, G.N.; FORTI, A.L.; ROCHA, S.O.; FRANCO, M.C.; FORTES, Z.B.; GIL, F.Z. The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in the offspring from diabetic mothers. **Pediatr Res**, v. 62, p. 145-150, 2007.

CAVELLERO, C.; MOSCA, L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocorticotrophic hormone treatment. **J Pathol Bacteriol**, v. 66, p. 147-151, 1953.

CERIELLO, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1589-96, 2003.

CHAMSEDDINE, A. H.; MILLER, F. J. J. Gp91phox contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts but not smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, n. 6, p. H2284-9, 2003.

CHANDNA, A.R.; KUHLMANN, N.; BRYCE, C.A.; GREBA, Q.; CAMPANUCCI, V.A.; HOWLAND, J.G. Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. **Neuroscience**, v. 303, p. 241-60, 2015.

CHANG, J.H.; GURLEY, S.B. Assessment of diabetic nephropathy in the Akita mouse. **Methods Mol Biol**, v. 933, p. 17-29, 2012.

CHATTOPADHYAY, M.; KHEMKA, V.K.; CHATTERJEE, G.; GANGULY, A.; MUKHOPADHYAY, S.; CHAKRABARTI, S. Enhanced ROS production and oxidative

damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. **Mol Cell Biochem**, v. 399, p. 95-103, 2015.

CHAVAKIS, T.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 6, n. 13, p. 1219–1225, 2004.

CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian J Endocrinol Metab**, v. 20, p. 546-51, 2016.

CHEN, F.; HAIGH, S.; BARMAN, S.; FULTON, D.J.R. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. **Front Physiol**, p. 412-418, 2012.

CHEN, G.; SUN, W.; LIANG, Y.; CHEN, T.; GUO, W.; TIAN, W. Maternal diabetes modulates offspring cell proliferation and apoptosis during odontogenesis via the TLR4/NF-kappaB signalling pathway. **Cell Prolif**, v. 50, p. 1-12, 2017.

CHEUNG, N.; MITCHELL, P.; WONG, T.Y. **Diab Retinop Lancet**. v. 376, n. 9735, p. 124-36, 2010.

CHILELLI, N. C.; BURLINA, S.; LAPOLLA, A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycooxidation-centric” point of view. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 23, n. 10, p. 913–919, 2013.

CHRISTERSSON, C.; THULIN, A.; SIEGBAHN, A. Microparticles during long-term follow-up after acute myocardial infarction. Association to atherosclerotic burden and risk of cardiovascular events. **Thromb Haemost**, p. 1-14, 2017.

CHUAH, Y.K.; BASIR, R.; TALIB, H.; TIE, T.H.; NORDIN, N. Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. **Int J Inflam**, v. 2013, p. 1-15, 2013.

CHUNG, S.S.M.; CHUNG, S.K. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. **Curr Drug Targets**, v. 6, p. 475–486, 2005.

CHUNG, S.S.M.; HO, E.C.M.; LAM, K.S.L.; CHUNG, S.S. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. S233–S236, 2003.

CHUONG, C.; KATZ, J.; PAULEY, K.M.; BULOSAN, M.; CHA, S. RAGE expression and NF-kappaB activation attenuated by extracellular domain of RAGE in human salivary gland cell line. **J Cell Physiol**, v. 221, n. 2, p. 430–434, 2009.

CINES, D.B.; POLLAK, E.S.; BUCK, C.A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G.A.; MCEVER, R.P.; POBER, J.S.; WICK, T.A.; KONKLE, B.A. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527-61, 1998.

CIPOLLONE, F.; IEZZI, A.; FAZIA, M.; ZUCCHELLI, M.; PINI, B.; CUCCURULLO C. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory

and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. **Circulation**, v. 108, p. 1070-7, 2003.

CIULLA, T.A.; AMADOR, A.G.; ZINMAN, B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. **Diabetes Care**, v. 26, p. 2653-64, 2003.

CLAUSEN, B. Influence of age on chondroitin sulfates and collagen of human aorta, myocardium and skin. **Lab Invest**, v. 12, p. 538-542, 1963.

CLAUSEN, T.D.; MATHIESEN, E.R.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O.; JENSEN, D.M.; LAUENBORG, J.; DAMM, P. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. **Diabetes Care**, v. 31, p. 340-346, 2008.

CLEMPUS, R. E.; SORESCU, D.; DIKALOVA, A.E.; POUKOVA, L.; JO, P.; SORESCU, G.P.; SCHMIDT, H.H.; LASSEGUE, B.; GRIENDLING, K.K. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 1, p. 42-48, 2007.

CODNER, E. Estrogen and type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Endocrinol Rev**, v. 6, p. 228-34, 2008.

CORPE, C.P.; BASALEH, M.M.; AFFLECK, J.; GOULD, G.; JESS, T.J.; KELLETT, G.L. The regulation of GLUT5 and GLUT2 activity in the adaptation of intestinal brush-border fructose transport in diabetes. **Pflugers Arch**, v. 432, p. 192-201, 1996.

CORTRIGHT, R.N.; COLLINS, H.L.; CHANDLER, M.P.; LEMON, P.W.; DICARLO, S.E. Diabetes reduces growth and body composition more in male than in female rats. **Physiol Behav.**, v.60, n. 5, p.1233-1238, 1996.

CRAIGE, S.M.; CHEN, K.; PEI, Y.; LI, C.; HUANG, X.; CHEN, C.; SHIBATA, R.; SATO, K.; WALSH, K.; KEANEY, J.F.JR. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. **Circulation**, v. 124, p. 731-40, 2011.

CSANYI, G.; TAYLOR, W.R.; PAGANO, P.J. NOX and inflammation in the vascular adventitia. **Free Radic Biol Med**, v. 47, p. 1254-1266, 2009.

CUMMINGS, M. Pancreatic exocrine insufficiency in type 1 and type 2 diabetes – more common than you think? **Journal of Diabetes Nursing**, v.18, n.8, p.320-323, 2014.

DABELEA, D.; HANSON, R.L.; LINDSAY, R.S.; PETTITT, D.J.; IMPERATORE, G.; GABIR, M.M.; ROUMAIN, J.; BENNETT, P.H.; KNOWLER, W.C. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 49, p. 2208-221, 2000.

D'AGATI, V.; SCHMIDT, A. M. RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, v. 6, n. 6, p. 352-360, 2010.

DA SILVA, O.A. Tese de Doutorado – **Impacto da hiperglicemia gestacional sobre o padrão morfofuncional cardíaco na prole adulta**. UFPE, Recife, 2015.

DAMASCENO, D.C. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p. 196-201, 2004.

DAMASCENO, D.C.; KISS, A.C.; SINZATO, Y.K.; DE CAMPOS, K.E.; RUDGE, M.V.; CALDERON, I.M. VOLPATO, G.T. Maternal-fetal outcome, lipid profile and oxidative stress of diabetic rats neonatally exposed to streptozotocin. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 119, n.7, p. 408–413, 2011.

DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; DE MATTOS PARANHOS CALDERON, I.; CUNHA RUDGE, M.V. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Anim Reprod Sci**, v. 72, n. 3-4, p. 235-44, 2002.

DAS, A.V.; PADAYATTI, P.S.; PAULOSE, C.S. Effect of leaf extract of *Aegle marmelose* (L.) Correa ex Roxb. On histological and ultrastructural changes in tissues of Streptozotocin induced diabetic rats. **Indian J. Exp. Biol**, v. 34, n. 4, p. 341-345, 1996.

DATTILO, B. M.; FRITZ, G.; LECLERC, E.; KOOI, C.W.; HEIZMANN, C.W. CHAZIN, W.J. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. **Biochem**, v. 46, n. 23, p. 6957–6970, 2007.

DAVALLI, P.; MITIC, T.; CAPORALI, A.; LAURIOLA, A.; D'ARCA, D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-18, 2016.

DAVIES, M.; BROPHY, S.; WILLIAMS, R.; TAYLOR, A. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1518-22, 2006.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, (23 Suppl 1), p. III27-32, 2004.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. **Auton Neurosci**, v. 145, n. 1-2, p. 145-150, 2009. DEBESSA, C.R.G.; MAIFRINO, L.B.M.; SOUZA R.R. Age related changes of the collagen network of the human heart. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 13, p. 1049-58, 2001.

DE QUEIROZ, D.B. **Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno: contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua repercussão em diferentes idades**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

DE ROSA, R.; VASA-NICOTERA, M.; LEISTNER, D.M.; REIS, S.M.; THOME, C.E.; BOECKEL, J-N. Coronary Atherosclerotic Plaque Characteristics and Cardiovascular Risk Factors-Insights From an Optical Coherence Tomography Study. **Circ J**, p. 1-10, 2017.

DE SÁ, F.G.; DE QUEIROZ, D.B.; RAMOS-ALVES, F.E.; SANTOS-ROCHA, J.; DA SILVA, O.A.; MOREIRA, H.S.; LEAL, G.A.; DA ROCHA, M.A.; DUARTE, G.P.; XAVIER, F.E. Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2. **Exp Physiol**, p. 1-13, 2017

DE SOUZA, M.S.; SINZATO, Y.K.; LIMA, P.H.; CALDERON, I.M.; RUDGE, M.V.; DAMASCENO, D.C. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. **Reprod BioMed**, v. 20, n. 4, p. 547–552, 2010.

DE SOUZA, R.R. Aging of myocardial collagen. **Biogerontology**, v. 3, n.6, 2002.

DEEDS, M.C.; ANDERSON, J.M.; ARMSTRONG, A.S.; GASTINEAU, D.A.; HIDDINGA, H.J.; JAHANGIR, A.; EBERHARDT, N.L.; KUDVA, Y.C. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **ab Anim.**, v. 45, n. 3, p.131-140, 2011.

DEGIRMENCHI, I.; KALENDER, S.; USTUNER, M.C.; KALENDER, Y.; GUNES, H.V.; UNAL, N.; BASARAN, A. The effects of acarbose and *Rumex patientia* on liver ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic (type-II) rats. **Drugs Exp Clin Res**, v. 28, p. 229-34, 2002.

DELFINO, V. D. A.; FIQUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNIA, A.M.; MOCELINA, A.J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DEMLING, N.; EHRHARDT, C.; KASPER, M.; LAUE, M.; KNELS, L.; RIEBER, E.P. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. **Cell Tissue Res**, v. 323, n. 3, p. 475–488, 2006.

DENG, Y.; DENG, Y.; HE, X.; CHU, J.; ZHOU, J.; ZHANG, Q. Prenatal inflammation-induced NF-kappaB dyshomeostasis contributes to renin-angiotensin system over-activity resulting in prenatally programmed hypertension in offspring. **Sci Rep**, v. 6, p. 1-20, 2016.

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

DING, Q.; KELLER, J. N. Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. **Neurosci Lett**, v. 373, n. 1, p. 67–72, 2005.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA 2009-2014. Daiichi Sankyo Brasil Farmacêutica Ltda. 6ªed. 2014.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Itapevi, SP: A, Araújo Silva Farmacêutica, 400p, 2009.

DOBLADO, M.; MOLEY, K. H. Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 14, p. 488-93, 2007.

DOLINOY, D.C. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. **Nutr Ver**, v. 66, p. 7-11, 2008.

DOLBER, P.C.; SPACH, M.S. Thin collagenous septa in cardiac muscle. **Anat Rec**, v. 128, n. 1, p. 45-55, 1987.

DONG, K.; NI, H.; WU, M.; TANG, Z.; HALIM, M.; SHI, D. ROS-mediated glucose metabolic reprogram induces insulin resistance in type 2 diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 476, p. 204-11, 2016.

DONOVAN, J.; BROWN, P. Parenteral Injections. **Curr Protoc Neurosci**, p. 1-7, 2005.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DU, X.L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; FANTUS, I.G.; GOLDBERG, H.; ZIYADEH, F.; WU, J.; BROWNLEE, M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 22, p. 12222-6, 2000.

DUTTA, S.; RITTINGER, K. Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. **PloS One**, v. 5, n. 5, p. e10478, 2010.

EJDESJÖ, A.; WENTZEL, P.; ERIKSSON, U.J. Influence of maternal metabolism and parental genetics on fetal maldevelopment in diabetic rat pregnancy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 10, p. E1198-209, 2012.

EL AOUI, S.; GENDRE, P.; SENNOUNE, S.R.; RIGOARD, P.; MAIXENT, J.M.; GRIENE, L. A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (*Psammomys obesus*). **Cell Molecular Biol (Noisy-le-Grand)**, v. 53 Suppl, p. OL943-53, 2007.

ELEAZU, C.O.; IROAGANACHI, M.; ELEAZU, K.C. Ameliorative potentials of cocoyam (*Colocasia esculenta* L.) and unripe plantain (*Musa paradisiaca* L.) on the relative tissue weights of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Diabetes Res**, p. 1-8, 2013a.

ELEAZU, C.O.; ELEAZU, K.C.; CHUKWUMA, S.; ESSIEN, U.N. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **J Diabetes Metab Disord**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2013b.

EL-MESALLAMY, H. O.; HAMDY, N.M.; EZZAT, O.A.; REDA, A.M. Levels of soluble advanced glycation end product-receptors and other soluble serum markers as indicators of diabetic neuropathy in the foot. **J Investig Med**, v. 59, n. 8, p. 1233–1238, 2011.

EL-REMESSY, A.B.; FRANKLIN, T.; GHALEY, N.; YANG, J.; BRANDS, M.W.; CALDWELL, R.B. Diabetes-induced superoxide anion and breakdown of the blood-retinal barrier: role of the VEGF/uPAR pathway. **PLoS One**, v. 8, p. 8-15, 2013.

ELSNER, M.; GULDBAKKE, B.; TIEDGE, M.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, v. 43, p. 1528–1533, 2007.

ERIKSSON, U.J.; CEDERBERG, J.; WENTZEL, P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers—animal and human studies. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 4, n. 1, p. 79-93, 2003.

ERIKSSON, U.J.; DAHLSTROM, E.; HELLERSTROM, C. Diabetes in pregnancy: skeletal malformations in the offspring of diabetic rats after intermittent withdrawal of insulin in early gestation. **Diabetes**, v. 32, p. 1141-45, 1983.

ERIKSSON, U.J.; JANSSON, L. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat. **Pediatr Res**, v. 18, p. 735- 38, 1984.

ESPINOSA-DIEZ, C.; MIGUEL, V.; MENNERICH, D.; KIETZMANN, T.; SÁNCHEZ-PÉREZ, P.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biol**, v. 6, p. 183–197, 2015.

ETUK, E.U.; MUHAMMED, B.J. Evidence based analysis of chemical method of induction of diabetes mellitus in experimental animals. **Asian J Exp Biol Sci**, v. 1, n. 2, p. 139-142, 2010.

EVELSON, P. et al. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetes rats. **Ann Hepatol**, v.4, n.2, p. 115-20, 2005.

FALCONE, C.; BOZZINI, S.; GUASTI, L.; D'ANGELO, A.; CAPETTINI, A.C.; PAGANINI, M.; FALCONE, R. Soluble RAGE Plasma Levels in Patients with Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FALCONE, C.; BOZZINI, S.; MATRONE, B.; COLONNA, A.; FALCONE, R.; CALCAGNINO, M. RAGE gene polymorphism in heart failure patients with and without angiographic evidence of significant coronary atherosclerosis. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 26, p. 199-206, 2013.

FENG, X.; ZHOU, X.; ZHANG, W.; LI, X.; HE, A.; LIU, B. Maternal High-sucrose Diets Altered Vascular Large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} Channels via Reactive Oxygen Species in Offspring Rats. **Biol Reprod**, p. 1-15, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Méd Bras**, v. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FERRER, J.; BENITO, C.; GOMIS, R. Pancreatic islet GLUT 2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. **Diabetes**, v. 44, p. 1369–1374, 1995.

FOGLIA, V. G. et al. Fetal and placental characteristics of pregnancy in pancreatectomized rats. **Rev Soc Argent Biol**, v.43, p.187–198, 1967.

FONG, D. S.; AIELLO, L.; GARDNER, T.W.; KING, G.L.; BLANKENSHIP, G. Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, p. 2540–2553, 2004.

FORSBERG, H.; BORG, L.A.; CAGLIERO, E.; ERIKSSON, U.J. Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. **Free Radic Res**, v. 24, p. 451–9, 1996.

FORSÉN, T.; ERIKSSON, J.; TUOMILEHTO, J.; REUNANEN, A.; OSMOND, C.; BARKER, D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. **Ann Intern Med**, v. 133, n. 3, p. 176-82, 2000.

FOWLER, M.J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. **Clin Diab**, v. 26, n. 2, p. 77-82, 2008.

FRANKEL, B. J. et al. Insulin, glucagon, and somatostatin release from the prediabetic Chinese hamster. **Diabetologia**, v. 27, p. 387-391, 1984.

FRANKS, P.W.; LOOKER, H.C.; KOBES, S.; TOUGER, L.; TATARANNI, P.A.; HANSON, R.L.; KNOWLER, W.C. Gestational glucose tolerance and risk of type 2 diabetes in young Pima Indian offspring. **Diabetes**, v. 55, p. 460-465, 2006.

FRIEDERICH, M.; HANSELL, P.; PALM, F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. **Curr Diabetes Rev.**, v. 5, p. 120-44, 2009.

FRIGGERI, A.; BANERJEE, S.; BISWAS, S.; DE FREITAS, A.; LIU, G.; BIERHAUS, A.; ABRAHAM, E. Participation of the receptor for advanced glycation end products in efferocytosis. **J Immunol**, v. 186, n. 11, p. 6191–6198, 2011.

FROMMHOLD, D., KAMPHUES, A.; HEPPER, I.; PRUENSTER, M.; LUKIC, I.K.; SOCHER, I. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. **Blood**, v. 116, n. 5, p. 841–849, 2010.

FRUSTACI, A.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, C.; JAKONIUK, I.; LERI, A.; MASERI, A. Myocardial cell death in human diabetes. **Circ Res**, v. 87, n. 12, p. 1123-32, 2000.

FULTON, D.J.R.; BARMAN, S.A. Clarity on the isoformspecific roles of NADPH oxidases and NADPH oxidase-4 in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 36, n. 4, p. 579-581, 2016.

GABBAY, K.H. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. **Ann Rev Med**, v. 26, p. 521–536, 1975.

GAO, X.; ZHANG, H.; SCHMIDT, A.M.; ZHANG, C. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 2, p. H491-8, 2008.

GEISZT, M.; KOOP, J.B.; VÁRNAI, P.; LETO, T.L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 14, p. 8010–8014, 2000.

GERALDES, P.; KING, G.L. Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. **Circ Res**, v. 106, n. 8, p. 1319-1331, 2010.

GEROLDI, D.; FALCONE, C.; EMANUELE, E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 17, p. 1971–1978, 2006.

GEWOLB, I.H.; MERDIAN, W.; WARSHAW, J.B.; ENDERS, A.C. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. **Diabetes**, v. 35, p. 1254-61, 1986.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Res**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 2010.

GIASSON, B. I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Rad Biol Med**, v. 32, n. 12, p. 1264–1275, 2002.

GILL-RANDALL, R.; ADAMS, D.; OLLERTON, R.L.; LEWIS, M.; ALCOLADO, J.C. Type 2 diabetes mellitus—genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. **Diabetologia**, v. 47, p. 1354-9, 2004.

GINTER, E.; SIMKO, V.; PANAKOVA, V. Antioxidants in health and disease. **Bratisl Lek Listy**, v. 115, p. 603-6, 2014.

GIROIX, M.H.; IRMINGER, J.C.; LACRAZ, G.; NOLL, C.; CALDERARI, S.; EHSES, J.A.; COULAUD, J.; CORNUT, M.; KASSIS, N. Hypercholesterolaemia, signs of islet microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki (GK) rat. **Diabetologia**, v. 54, n. 9, p. 2451-62, 2011.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J.A.; SCHMIDT, A.M.; CREAGER, M.A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597–605, 2006.

GOMES, R.J.; LEME, J.A.; DE MOURA, L.P.; DE ARAÚJO, M.B.; ROGATOO, G.P.; DE MOURA. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. **Cell Biochem Fun**, v. 24, n. 4, p. 199-204, 2009.

GONZÁLEZ-SANTAMARÍA, J.; VILLALBA, M.; BUSNADIEGO, O.; LÓPEZ-OLANETA, M.M.; SANDOVAL, P.; SNABEL, J.; LÓPEZ-CABRERA, M.; ERLER, J.T.; HANEMAAIJER, R.; LARA-PEZZI, E.; RODRÍGUEZ-PASCUAL, F. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. **Cardiovasc Res**, v. 109, n. 1, p. 67-78, 2016.

GOOVA, M. T.; LI, J.; KISLINGER, T.; QU, W.; LU, Y.; BUCCIARELLI, L.G.; NOWYGRÓD, S.; WOLF, B.M.; CALISTE, X. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. **Am J Pathol**, v. 159, n. 2, p. 513–525, 2001.

GORIN, Y.; BLOCK, K. Nox as a target for diabetic complications. **Clin Sci (Lond)**, v. 125, p. 361-82, 2013.

GRAY, S.P.; DI MARCO, E.; KENNEDY, K.; CHEW, P.; OKABE, J.; EL-OSTA, A.; CALKIN, A.C.; BIESSEN, E.A.; TOUYZ, R.M.; COOPER, M.E.; SCHMIDT, H.H.;

JANDELEIT-DAHM, K.A. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 36, n. 2, p. 295-307, 2016.

GRAY, S.P.; JANDELEIT-DAHM, K. The pathobiology of diabetic vascular complications--cardiovascular and kidney disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 5, p. 441-452, 2014.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREENE SF, JOHNSON PR, EIFFERT KC, GREENWOODT MR, STERN JS. The male obese Wistar diabetic fatty rat is a new model of extreme insulin resistance. **Obes Res**, v. 2, p. 432-43, 1994.

GRUNDY, S. M.; BENJAMIN, I.J.; BURKE, G.L.; CHAIT, A.; ECKEL, R.H. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 100, n. 10, p. 1134-1146, 1999.

GUARINO, M.P.; SANTOS, A.L.; MOTA-CARMO, M.; COSTA, P.F. Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. **In Vivo**, v. 27, p. 127-132, 2013.

GUO, J.; ANANTHAKRISHNAN, R.; QU, W.; LU, Y.; REINIGER, N.; ZENG, S. RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis. **J Am Soc Nephrol: JASN**, v. 19, n. 5, p. 961-972, 2008.

GUO, S.; CHEN, X. The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance. **J Drug Target**, v. 23, n. 10, p. 888-96, 2015.

GUO, Z.; QI, W.; YU, Y.; DU, S.; WU, J.; LIU, J. Effect of exenatide on the cardiac expression of adiponectin receptor 1 and NADPH oxidase subunits and heart function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 6, p. 961-972, 2014.

HAKIM, Z. S.; PATEL, B. K.; GOYAL, R. K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 41, n. 4, p. 353-60, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press: New York, 3ed., 936p, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, n. 2, p. 501-514, 1986.

HAMDEN, K.; ALLOUCHE, N.; DAMAK, M.; ELFEKI, A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. **Chem Biol Interact**, v. 180, n. 3, p. 421-432, 2009.

HAN, B.; BALIGA, R.; HUANG, H.; GIANNONE, P.J.; BAUER, J.A. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and redox imbalance in murine diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 2, p. H829-35, 2009.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochem Soc Trans**, v. 29, n. Pt 2, p. 345–350, 2001.

HARDT, P.D.; EWALD, N. Exocrine Pancreatic Insufficiency in Diabetes Mellitus: A Complication of Diabetic Neuropathy or a Different Type of Diabetes? **Exp Diabetes Res**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

HAURANI, M. J.; CIFUENTES, M.E.; SHEPARD, A.D.; PAGANO, P.J. Nox4 oxidase overexpression specifically decreases endogenous Nox4 mRNA and inhibits angiotensin II-induced adventitial myofibroblast migration. **Hypertension**, v. 52, n. 1, p. 143–149, 2008.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev**, v. 26, n. 3, p. 203–234, 2012.

HEARD, C. R.; TURNER, M. R. Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. **Diabetes**, v. 16, n. 2, p. 96–107, 1967.

HEIER, M.; MARGEIRSDOTTIR, H.D.; GAARDER, M. Soluble RAGE and atherosclerosis in youth with type 1 diabetes: a 5- year follow-up study. **Cardiovas Diabetol**, v. 14, p. 126, 2015.

HEINONEN, S.E.; GENOVE, G.; BENGTSSON, E.; HUBSCHLE, T.; AKESSON, L.; HISS, K. Animal models of diabetic macrovascular complications: key players in the development of new therapeutic approaches. **J Diabetes Res**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

HERRERA, E.; PALACIN, M.; MARTIN, A.; LASUNCION, M.A. Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. **Diabetes**, v. 34, p. 42-6, 1985.

HILEMAN, E.A.; ACHANTA, G.; HUANG, P. Superoxide dismutase: An emerging target for cancer therapeutics. **Expert Opin Ther Targets**, v. 5, p. 697–710, 2001.

HIRST, D.G.; ROBSON, T. Nitric oxide physiology and pathology. **Methods Mol Biol**, v. 704, p. 1-13, 2011.

HINKEL, R.; HOEWE, A.; RENNER, S.; NG, J.; LEE, S.; KLETT, K.; MORETTI, A. Diabetes Mellitus-Induced Microvascular Destabilization in the Myocardium. **J Am Coll Cardiol**, v. 69, n. 2, p. 131-143, 2017.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, 1976.

HOD, M.; KAPUR, A.; SACKS, D.A.; HADAR, E.; AGARWAL, M. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. **Int J Gynaecol Obstet**, p. 173-211, 2015.

HOLEMANS, K.; AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A. Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 34, n. 2, p. 81-5, 1991.

HOLEMANS, K.; GERBER, R.T.; MEURRENS, K.; DE CLERCK, F.; POSTON, L.; VAN ASSCHE, F.A. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Diabetologia**, v. 42, p. 81–89, 1999.

HORI, O.; BRETT, J.; SLATTERY, T.; CAO, R.; ZHANG, J.; CHEN, J.X.; NAGASHIMA, M. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. **J Biol Chem**, v. 270, n. 43, p. 25752–25761, 1995.

HOU, J.; ZHENG, D.; FUNG, G.; DENG, H.; CHEN, L.; LIANG, J. Mangiferin suppressed advanced glycation end products (AGEs) through NF-kappaB deactivation and displayed anti-inflammatory effects in streptozotocin and high fat diet-diabetic cardiomyopathy rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 94, p. 332-40, 2016.

HOWARD, S.G.; HEINDEL, J.J.; THAYER, K.A.; PORTA, M. Environmental pollutants and beta cell function: relevance for type 1 and gestational diabetes. **Diabetologia**, v. 54, n. 12, p. 3168-3169, 2011.

HOWARTH, F.C et al. Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 4, p. 327-231, 2006.

HUO, L.; HARDING, J.L.; PEETERS, A.; SHAW, J.E.; MAGLIANO, D.J.; Life expectancy of type 1 diabetic patients during 1997-2010: a national Australian registry-based cohort study. **Diabetologia**, p. 1177-1185, 2016.

HWANG, J.; KLEINHENZ, D.J.; RUPNOW, H.L.; CAMPBELL, A.G.; THULE, P.M.; SUTLIFF, R.L. The PPARgamma ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice. **Vascul Pharmacol**, v. 46, p. 456-62, 2007.

IDF DIABETES ATLAS, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Atlas**. Sixth Edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

IDF, DIABETES ATLAS, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Global Prevalence Diabetes. **IDF Atlas**. 4th Edition, 2009.

INDO, H.P.; YEN, H-C.; NAKANISHI, I.; MATSUMOTO, K-I.; TAMURA, M.; NAGANO, Y. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **J Clin Biochem Nutr**, v. 56, p. 1-7, 2015.

INOUCHI, T.; BATTAN, R.; HANDLER, E.; SPORTSMAN, J.R.; HEATH, W.; KING, G.L. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p. 11059–11063, 1992.

INZUCCHI, S.E.; SHERWIN, R.S. **Diabetes mellitus tipo 1**. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. *Cecil Tratado de Medicina Interna*, 23ed. Rio de Janeiro: Elsevier, v.2, cap. 247, p.1988- 2013, 2010a.

ISHII, H.; JIROUSEK, M.R.; KOYA, D.; TAKAGI, C.; XIA, P.; CLERMONT, A.; BURSELL, S.E.; KERN, T.S.; BALLAS, L.M.; HEATH, W.F.; STRAMM, L.E.; FEENER, E.P.; KING, G.L. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. **Science New York, N Y**, v. 272, n. 728–731, 1996.

IWGDF, International Working Group on the Diabetic Foot. **Guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes**, 2015.

JACOB, T.A.; SOARES, L.R.; SANTOS, M.R.; SANTOS, L.R.; SANTOS, E.R.; TORRES, G.C.; SILVA, V.Y.N.E.; KASHIWABARA, T.G.B. Diabetes mellitus gestacional: uma revisão de literatura. **BJSCR**, v. 6, n. 2, p.33-37, 2014.

JANSSON, T.; CETIN, I.; POWELL, T.L.; DESOYE, G.; RADAELLI, T.; ERICSSON, A.; SIBLEY, C.P. Placental transport and metabolism in fetal overgrowth—a workshop report. **Placenta**, v. 27, p. S109-13, 2006.

JANSSON, T.; POWELL, T.L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. **Clin Sci (Lond)**, v. 113, p. 1-13, 2007.

JAWERBAUM, A.; WHITE, V. Animal Models in Diabetes and Pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 5, p. 680–701, 2010.

JIWANI, A.; MARSEILLE, E.; LOHSE, N.; DAMM, P.; HOD, M.; KAHN, J.G. Gestational diabetes mellitus: results from a survey of country prevalence and practices. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. 6, p. 600–610, 2012.

LEE, J.H.; YANG, S.H.; OH, J.M.; LEE, M.G. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, p. 1-23, 2010.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A.E.; RENOLD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med**, v., n. 1, p. 201-5, 1967.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest**, v. 48, n. 11, p. 2129–2139, 1969.

KAHN, S.E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 3-19, 2003.

KAKU, K.; PROVINCE, M.; PERMUTT, M.A. Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with a limited capacity to synthesize insulin in C57BL/KS mice: evicence for polygenic control. **Diabetologia**, v. 32, n. 9, p. 636-643, 1989.

KALEA, A. Z.; SCHMIDT, A. M.; HUDSON, B. I. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 8, p. 621–637, 2009.

KALEEM, M.; ASIF, M.; AHMED, Q.U.; BANO, B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Singapore Med J**, v. 47, p. 670–5, 2006.

KANETO, H.; XU, G.; FUJIII, N.; KIM, S. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. **J Biol Chem**, v. 277, n. 33, p. 30010-8, 2002.

KANG, M-K.; CHUNG, W-B.; HONG, S-K.; KIM, O-R.; IHM, S-H.; CHANG, K. Effects of candesartan cilexetil and amlodipine orotate on receptor for advanced glycation end products expression in the aortic wall of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OETFf) type 2 diabetic rats. **Arch Pharm Res**, v. 39, p. 565-76, 2016.

KANNEL, W.B.; MCGEE, D.L. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. **Diabetes Care**, v. 2, p. 120-6, 1979.

KATAKAMI, N.; MATSUHISA, M.; KANETA, H.; YAMASAKI, Y. Serum endogenous secretory RAGE levels are inversely associated with carotid IMT in type 2 diabetic patients. **Atherosclerosis** Ireland, 2007.

KATKHUDA, R.; PETERSON, E.S.; ROGHAI, R.D.; NORRIS, A.W. Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. **Pediatr Res**, v. 72, n. 4, p. 352-361, 2012.

KATZ, A.; CARAMORI, M.L.A.; SISSON-ROSS, S.; GROPPOLI, T.; BASGEN, J.M.; MAUER, M. An increase in the cell component of the cortical interstitium antedates interstitial fibrosis in type 1 diabetic patients. **Kidney Int**, v. 61, p. 2058-66, 2002.

KAY, A.M.; SIMPSON, C.L.; STEWART, J.A.J. The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification. **J Diabetes Res**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

KAY, T. W.; THOMAS, H.E.; HARRISON, L.C.; ALLISON, J. The cell in autoimmune diabetes: many mechanisms and pathways of loss. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 11–15, 2000.

KAYA-DAGISTANLI, F.; OZTURK, M. The role of clusterin on pancreatic beta cell regeneration after exendin-4 treatment in neonatal streptozotocin-administrated rats. **Acta Histochem.**, v. 115, n. 6, p. 577-586, 2013.

KEELY, E. J.; MALCOLM, J.C.; HADJIYANNAKIS, S.; GABOURY, I.; LOUGH, G.; LAWSON, M. Prevalence of metabolic markers of insulin resistance in offspring of gestational diabetes pregnancies. **Pediatr Diabetes**, v. 9, p. 53-59, 2008.

KENNEDY, G. C.; LIMPSCOMB, H. C.; HAGUE, P. Plasma corticosterone in rat with experimental diabetes insipidus. **J Endocrinol**, v. 14, p. 345-353, 1963.

- KENSARA, O. A.; WOOTTON, S. A.; PHILLIPS, D. I. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual energy xray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. **Am J Clin Nutr**, v. 82 n. 5, p. 980-987, 2005.
- KEOGH, R.J.; DUNLOP, M.E.; LARKINS, R.G.; The effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C and phospholipase A2 activation. **Metabolism**, v. 46, p. 41–47, 1997.
- KERKENI, M.; SAÏDI, A.; BOUZIDI, H.; BEM YAHYA, S.; HAMMAMI, M. Elevated serum levels of AGEs, sRAGE, and pentosidine in Tunisian patients with severity of diabetic retinopathy. **Microvasc Res**, v. 84, n. 3, p. 378-383, 2012.
- KERN, H.; LOGOTHETOPOULOS, J. Steroid diabetes in the guinea pig: studies on islet cell ultrastructure and regeneration. **Diabetes**, v. 19, p.145-151, 1970.
- KESAVULU, M.M.; GIRI, R.; KAMESWARA RAO, B.; APPARAO, C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. **Diabetes Metab**, v. 26, p. 387–392, 2000.
- KHAN, N.A. Role of lipids and fatty acids in macrosomic offspring of diabetic pregnancy. **Cell Biochem Biophys**, v. 48, p. 79-88, 2007.
- KHODEER, D.M.; ZAITONE, S.A.; FARAG, N.E.; MOUSTAFA, Y.M. Cardioprotective effect of pioglitazone in diabetic and non-diabetic rats subjected to acute myocardial infarction involves suppression of AGE-RAGE axis and inhibition of apoptosis. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 94, p. 463–76, 2016.
- KINOSHITA, J.H.; NISHIMURA, C. The involvement of aldose-reductase in diabetic complications. **Diabetes/Metabolism Rev**, v. 4, p. 323–337, 1988.
- KNOWLTON, A.A.; LEE, A.R. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacol Ther**, v. 135, n. 1, p. 54-70, 2012.
- KIM, J.-K.; PARK, S.; LEE, M.J.; SONG, Y.R.; HAN, S.H.; KIM, S.G.; KANG, S.W. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 1, p. 208–214, 2012.
- KINALSKI, M.; SLEDZIEWSKI, A.; TELEJKO, B.; ZARZYCKI, W.; KINALSKA, I. Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. **Acta Diabetol**, v. 37, p. 179–83, 2000.
- KING, J. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 71, p. 12185-259, 2000.
- KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. **Am J Respir Crit Med**, v. 167, n. 12, p. 1600–1619, 2003.

KOEHN, J.; FOUNTOLAKIS, M.; KRAPPENBAUER, K. Multiple drug resistance associated with function of ABC-transporters in diabetes mellitus: molecular mechanism and clinical relevance. **Infect Disord Drug Targets**, v. 8, p. 109–118, 2008.

KOENERS, M.P.; WESSELING, S.; SANCHEZ, M.; BRAAM, B.; JOLLES, J.A. Perinatal Inhibition of NF-KappaB Has Long-Term Antihypertensive and Renoprotective Effects in Fawn-Hooded Hypertensive Rats. **Am J Hypertens**, v. 29, p. 123–31, 2016.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes Metab Rev**, v. 3, p. 751–778, 1987.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J Biol Chem**, v. 257, n. 10, p. 5751–4, 1982.

KONRAD, R.J. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochem J**, v. 356, p. 31–41, 2001.

KOUKKOU, E.; GHOSH, P.; LOWY, C.; POSTON, L. Offspring of normal and diabetic rats fed saturated fat in pregnancy demonstrate vascular dysfunction. **Circulation**, v. 98, p. 2899–2904, 1998.

KOULIS, C.; WATSON, A.M.D.; GRAY, S.P.; JANDELEIT-DAHME, K.A. Linking RAGE and Nox in diabetic micro- and macrovascular complications. **Diabetes Metab** v. 41, p. 272–81, 2015.

KRENTZ, A.J. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. **Diab Obes Metab**, v. 5, p. 19–27, 2003.

KUMAR, V.; AHMED, D.; GUPTA, P.S.; ANWAR, F.; MUJEEB, M. Anti-diabetic, anti-oxidant and anti-hyperlipidemic activities of *Melastoma malabathricum* Linn. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 1–19, 2013.

KUMAWAT, M.; SHARMA, T.K.; SINGH, I.; SINGH, N.; GHALAUT, V.S.; VARDEY, S.K. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. **N Am J Med Sci**, v. 5, p. 213–9, 2013.

KURODA, J.; AGO, T.; MATSUSHIMA, S.; ZHAI, P.; SCNEIDER, M.D.; SADOSHIMA, J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 107, n. 35, p. 15565–15570, 2010.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**, v. 15, n. 71, p. 1–67, 2016.

LAAKSONEN, D. E. et al. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 156, n. 11, p. 1070–7, 2002.

LAMBETH, J.D.; NEISH, A.S. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 119–45, 2014.

LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; PRICE, S.R.; MCCANN, L.; FUKAI, T.; HOLLAND, S.M.; MITCH, W.E.; HARRISON, D.G. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **J Clin Invest.**, v. 111, p. 1201-9, 2003.

LANGER, O.; CONWAY, D.L.; BERKUS, M.D.; XENAKIS, E.M.; GONZALES, O. A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 343, n. 16, p. 1134–1138, 2000.

LAPPAS, M.; YEE, K.; PERMEZEL, M.; RICE, G.E. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus complicated pregnancies. **J Endocrinology**, v. 186, p. 457-65, 2005.

LASSEQUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 2, p. R277-97, 2003.

LASSEQUE, B.; GRIENDLING, K.K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 4, p. 653-659, 2010.

LASSEQUE, B.; SORESCU, D.; SZOCS, K.; YIN, Q.; AKERS, M.; ZHANG, Y.; GRANT, S.L.; LAMBETH, J.D.; GRIENDLING, K.K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circ Res**, v. 88, p. 888-894, 2001.

LAW, C.M. Fetal and infant influences on non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). **Diabetic Medicine**, v. 13, n. 9, p. 49-52, 1996.

LE BLANC, S.; VILLARROEL, P.; CANDIA, V.; GAVILAN, N.; SOTO, N.; PEREZ-BRAVO, F. Type 2 diabetic patients and their offspring show altered parameters of iron status, oxidative stress and genes related to mitochondrial activity. **Biomaterials**, v. 25, p. 725–35, 2012.

LE MAY, C.; CHU, K.; HU, M.; ORTEGA, C.S.; SIMPSON, E.R.; KORACH, K.S.; TSAI, M.J.; MAUVAIS-JARVIS, F. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n. 24, p. 9232-7, 2006.

LECLERC, E.; FRITZ, G.; VETTER, S.W.; HEIZMANN, C.W. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 6, p. 993–1007, 2009.

LEITER, E.H. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 2, p.630–634, 1982.

LENZEN, S. Alloxan and streptozotocin diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2007.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. **Diabetologia**, v. 1, p. 216–226, 2008.

LETO, T.L.; MORAND, S.; HURT, D.; UHEYAMA, T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 10, p. 2607-2619, 2009.

LEUNG, S.S.; FORBES, J.M.; BORG, D.J. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in Type 1 Diabetes Pathogenesis. **Curr Diab Rep**, v. 16, 2016.

LEWIS, C.; BARBIERS, A.R. Streptozotocin, a new antibiotic. *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Antibiot Ann.**, v. 7, p. 247–254, 1959.

LI, Y.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; MELOV, S.; URSELL, P.C.; OLSON, J.L. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat Genet**, v. 11, p. 376-81, 1995.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135-43, 2002.

LIKE, A. A.; CHICK, W. L. Pancreatic beta cell replication induced by glucocorticoids in subhuman primates. **Am J Pathol**, v. 75, p. 329-332, 1974.

LIPINSKI, B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. **Oxid Med Cell Longev**, p. 1-9, 2011.

LIRA, E.C.; SANTOS, G.M.R.F.; TEIXEIRA-SILVA, J.J.; DUARTE, G.I.B.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.; SILVA, C.O. Exposição ao diabetes gestacional: alterações sobre os parâmetros de estresse oxidativo e acúmulo de ferro esplênico em ratos. **Infarma**, v. 27, n 4, 2015.

LIU, Z.; BARRETT, E.J.; DALKIN, A.C.; ZWART, A.D.; CHOU, J.Y. Effect of acute diabetes on rat hepatic glucose-6-phosphatase activity and its messenger RNA level. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 205, p. 680-6, 1994.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev**, v. 4, p. 118-26, 2010.

LOPEZ-SOLDADO, I.; HERRERA, E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. **Experimental Diabetes Research**, v. 4, n. 2, p. 107–118, 2003.

LOWE, W. L. **Genetics of diabetes mellitus**. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, 2001.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. **Ukr Biochem J**, v. 87, n. 6, p. 11-8, 2015.

MAALOUF, R. M.; EID, A.A.; GORIN, Y.C.; BLOCK, K.; ESCOBAR, G.P.; BAILEY, S.; ABOUD, H.E. Nox4-derived reactive oxygen species mediate cardiomyocyte injury in early type 1 diabetes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 302, n. 3, p. C597-604, 2012.

MAASSEN, J. A.; 'T HART, L. M.; VAN ESSEN, E.; HEINE, R. J.; NIJPELS, G. Mitochondrial Diabetes: Molecular Mechanisms and Clinical Presentation. **Diabetes**, v. 53, p.104-109, 2004.

MACNEE, W.; RAHMAN, I. Is oxidative stress central the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? **Trends Mol Med**, v. 7, p. 55-62, 2001.

MAEDA, Y.; INOBUCHI, T.; TAKEI, R.; HENDARTO, H.; IDE, M.; INOUE, T. Chymase inhibition prevents myocardial fibrosis through the attenuation of NOX4-associated oxidative stress in diabetic hamsters. **J Diabetes Investig**, v. 3, p. 354-61, 2012.

MAHFOZ, A.M.; EL-LATIF, H.A.A.; AHMED, L.A.; HASSANEIN, N.M.; SHOKA, A.A. Anti-diabetic and renoprotective effects of aliskiren in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in female rats. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 389, p. 1315-24, 2016.

MALERBI, D.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30 a 69 years. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1509-1516, 1992.

MARCINIAK, A.; PATRO-MALYSZA, J.; KIMBER-TROJNAR, Ż.; MARCINIAK, B.; OLESZCZUK, J.; LESZCZYŃSKA-GORZELAK, B. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 56, n. 2, p; 133-138, 2017.

MARTIN-TIMON, I.; SEVILLANO-COLLANTES, C.; SEGURA-GALINDO, A.; DEL CANIZO-GOMEZ, F.J. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? **World J Diabetes**, v. 5, p. 444-70, 2014.

MARTINS, J.O.; PANÍCIO M.I.; DANTAS, M.O.; GOMES, G.N. Effect of maternal diabetes on female offspring. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 4, p. 413-9, 2014.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem**, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.

MASSUCATTI, L.A.; PEREIRA, R.A.; MAIOLI, T.U. Prevalência de diabetes gestacional em unidades de saúde básica. **REAS**, p. 71-79, 2012.

MATHEBULA, S.D. Polyol pathway: A possible mechanism of diabetes complications in the eye. **Afr. Vision Eye Health**, v. 74, n. 1, 2015.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-19, 1985.

- MATTHEWS, J.N.; ALTMAN, D.G.; CAMPBELL, M.J.; ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **BMJ**, v. 300, n. 6719, p. 230-5, 1990.
- MATTOUGH, F.A.; BUDIN, S.B.; HAMID, Z.A.; ALWAHAIBI, N.; MOHAMED, J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. **Sultan Qaboos Univ Med J**, v. 12, p. 5-18, 2012.
- MATSUSHIMA, S.; KURODA, J.; AGO, T.; ZHAI, P.; PARK, J.Y.; XIE, L-H. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. **Circ Res**, v. 112, p. 651-63, 2013.
- MATSUURA, Y.; YAMASHITA, A.; ZHAO, Y.; IWAKIRI, T.; YAMASAKI, K.; SUGITA, C. Altered glucose metabolism and hypoxic response in alloxan-induced diabetic atherosclerosis in rabbits. **PLoS One**, v. 12, p. 1-25, 2017.
- MAUER, M.; DRUMMOND, K. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: I. Study design and baseline characteristics of the study participants. **Diabetes**, v. 51, p. 1572-9, 2002.
- MAUER, S.M.; STEFFES, M.W.; BROWN, DM. The kidney in diabetes. **Am J Med**, v. 70, n. 3, p. 603-12, 1981.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.
- MACKLON, N.S.; HOP, W.C.; WLADIMIROFF, J.W. Fetal cardiac function and septal thickness in diabetic pregnancy: a controlled observational and reproducibility study. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 105, n. 6, p. 661-6, 1998.
- MCLELLAN, K. C. P. et al. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007.
- MCNEILL, J.H. **Experimental models of diabetes**. Boca Raton, Fla: CRC Press LLC; 424 p, 1999.
- MEDUCORAC, I. Characterization of intramuscular collagen in the mammalian left ventricle. **Basic Res Cardiol**, v. 77, p. 589-598, 1982.
- MENEZES, H.S.; BARRA, M.; BELLO, A.R.; MARTINS, C.B.; ZIELINSKY, P. Fetal myocardial hypertrophy in an experimental model of gestational diabetes. **Cardiol Young**, v. 11, n. 6, p. 609-13, 2001.
- MERZOUK, H.; MADANI, S.; CHABANE SARI, D.; PROST, J.; BOUCHENAK, M.; BELLEVILLE, J. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Clin Sci**, v. 98, p. 21-30, 2000.
- MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med**, v. 17, n. 3, p. 235–248, 1994.

MILLER, A.A.; DRUMMOND, G.R.; MAST, A.E. SCHMIDT, H.H.H.W.; SOBEY, C.G. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. **Stroke**, v. 38, n. 7, p. 2142–2149, 2007.

MILLER, A.A.; DRUMMOND, G.R.; SCHMIDT, H.H.H.W.; SOBEY, C.G. NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. **Circ. Res**, v. 97, n. 10, p. 1055–1062, 2005.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p. 3170-5, 1972.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MOEN, G.H.; SOMMER, C.; PRASAD, R.B.; SLETNER, L.; GROOP, L.; QVIGSTAD, E.; BIRKELAND, K.I. **Mechanisms in endocrinology: Epigenetic modifications and gestational diabetes: a systematic review of published literature**. Eur J Endocrinol, v. 176, n. 5, p. R247-R267, 2017.

MOHAMADIN, A.M.A.; HAMMAD, L.N.A.; EL-BAB, M.F.; GAWAD, H.S.A. Can nitric oxide-generating compounds improve the oxidative stress response in experimentally diabetic rats? **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, p. 586-93, 2007.

MOHAMED, A. K. et al. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. **BioFactors**, v. 10, p. 157-167, 1999.

MOLITCH, M.E.; DEFRONZO, R.A.; FRANZ, M.J.; KEANE, W.F.; MOGENSEN, C.E.; MONNIER, V.M.; SELL, D.R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Ann NY Acad Sci**, v. 1043, p. 567-81, 2005.

MONTECUCCO, F.; MACH, F. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **Semin Immunopathol**, v. 31, n. 1, p. 1-3, 2009.

MOORADIAN, A.D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 5, n. 3, p. 150-9, 2009.

MORAN, T. H; BI, S. Hyperphagia and obesity of OLETF rats lacking CCK1 receptors: developmental aspects. **Dev Psychobiol**, v. 48, n. 5, p. 360-367, 2006.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE, PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE – 2013. **Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas**. Brasil grandes regiões e unidades da federação. Rio de janeiro, p. 1-18, 2014.

MYLONAS, C.; KOURETAS, D. Lipid peroxidation and tissue damage. **In Vivo**, v. 13, n. 3, p. 295-309, 1999.

NADERI, R.; MOHADDES, G.; MOHAMMADI, M.; ALIHEMMATI, A.; BADALZADEH, R.; GHAZNAVI, R. Preventive effects of garlic (*Allium sativum*) on oxidative stress and

histopathology of cardiac tissue in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta Physiol Hung**, v. 102, p. 380-90, 2015.

NAKAMURA, M.; NAGAFUCHI, S.; YAMAGUCHI, K.; TAKAKI, R. The role of thymic immunity and insulinitis in the development of streptozotocin-induced diabetes in mice.

Diabetes, v. 33, n. 9, p. 894–900, 1984.

NAKHOODA, A. F.; LIKE, A.A.; CHAPPEL, C.L.; MURRAY, F.T.; MARLISS, E.B. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. **Diabetes**, v. 26, p. 100–112, 1977.

NANDI, A.; WANG, X.; ACCILI, D.; WOLGMUTH, D.J. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1863-1871, 2010.

NATIONAL DIABETES DATA GROUP (NDDG). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v. 28, p. 1039-1057, 1979.

NEEPER, M.; SCHMIDT, A.M.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WANG, F.; PAN, Y.C. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem**, v. 267, p. 14998–5004, 1992.

NEHIRI, T.; DUONG VAN HUYEN, J.P.; VILTARD, M.; FASSOT, C.; HEUDES, D.; FREUND, N.; DESCHÊNES, G.; HOUILLIER, P.; BRUNEVAL, P.; LEVIÈVRE-PÉGORIER, M. Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. **Diabetes**, v. 57, p. 2167–2175, 2008.

NGUYEN, D.V.; SHAW, L.C.; GRANT, M.B. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 3, n. 170. P. 1-25, 2012.

NIELSEN, K.K.; KAPUR, A.; DAMM, P.; COURTEN, M.; BYGBJERG I.C. From screening to postpartum follow-up - the determinants and barriers for gestational diabetes mellitus (GDM) services, a systematic review. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 22, p. 14-41, 2014.

NIEUWENHUIZEN, A.G.; SCHUILING, G.A.; MOES, H.; KOITER, T.R. Role of increased insulin demand in the adaptation of the endocrine pancreas to pregnancy. **Acta Physiol Scand**, v. 159, n. 4, p. 303-12, 1997.

NIJMEH, J.; MOLDOBAEVA, A.; WAGNER, E.M. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 299, p. L535-41, 2010.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

ODUM, E.P.; EJILEMELE, A.A.; WAKWE, V.C. Antioxidant status of type 2 diabetic patients in Port Harcourt, Nigeria. **Niger J Clin Pract**, v. 15, p. 55-8, 2012.

OKRUHLICOVA, L.; TRIBULOVA, N.; WEISMANN, P.; SOTNIKOVA, R. Ultrastructure and histochemistry of rat myocardial capillary endothelial cells in response to diabetes and hypertension. **Cell Res**, v. 15, n. 7, p. 532-8, 2005.

OLIN, B. R. **Loseleaf drug information service**. St. Louis: Facts and Comparisons, 1990.

OLIVEIRA, D.R.F. **Diabetes gestacional induzida por estreptozotocina: implicações cardíacas na prole adulta**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enfermagem) – Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, 2014.

ONUTA, G.; WESTERWEEL, P.E.; ZANDVOORT, A.; VAN RIEZEN, M.; ROZING, J.; HILLEBRANDS, J-L. Angiogenic sprouting from the aortic vascular wall is impaired in the BB rat model of autoimmune diabetes. **Microvasc Res**, v. 75, p. 420-5, 2008.

ORLOVA, V.V.; CHOI, E.Y.; XIE, C.; CHAVAKIS, E.; BIERHAUS, A.; IHANUS, E.A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. **EMBO J**, v. 26, n. 4, p. 1129–1139, 2007.

ORNOY, A.; YAFFE, P.; ZANGEN, S.W. The Cohen diabetic rat as a model for fetal growth restriction: vitamins CandEreduce fetal oxidative stress butdonot restore normal growth. **Reprod Toxicol**, v. 28, p. 521–529, 2009.

ORNOY, A.; ZAKEN, V.; KOHEN, R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. **Teratology**, v. 60, p. 376–86, 1999.

ORNOY, A; REECE, E.A.; PAVLINKOVA, G.; KAPPEN, C.; MILLER, R.K. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 105, n. 1, p. 53-72, 2015.

OZANNE, S.E.; HALES, C.N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. **Proc Nutr Soc**, v. 58, n. 3, p. 615-9, 1999.

PARAVICINI, T.M., CHRISOBOLOS, S., DRUMMOND, G.R., SOBEY, C.,G. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. **Circ Res**. V. 91, p. 54-61, 2002.

PARI, L.; SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of diasulin, a herbal drug, on blood glucose, plasma insulin and hepatic enzymes of glucose metabolism in hyperglycaemic rats. **Diabetes Obes Metab**, v. 6, p. 286-92, 2004.

PARK, L.; RAMAN, K.G.; LEE, K.J.; LU, Y.; FERRAN, L.J.JR. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. **Nat. Med**, v. 4, n. 9, p. 1025–1031, 1998.

PARK, S.Y.; KIM, Y.A.; HONG, Y.H.; MOON, M.K.; KOO, B.K.; KIM, T.W. Up-regulation of the receptor for advanced glycation end products in the skin biopsy specimens of

patients with severe diabetic neuropathy. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 10, n. 4, p. 334–341, 2014.

PARVING, H.H.; STEFFES, M.W. Nephropathy in diabetes. **Diabetes care**, v. 27 Suppl 1, p. S79-83, 2004.

PASEK, R.C.; GANNON, M. Advancements and challenges in generating accurate animal models of gestational diabetes mellitus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 11, p. E1327-38, 2013.

PATLAS, N.; ZIV, E.; ORNOY, A.; SHAFRIR, E. Pregnancy outcome in the *Psammomys obesus* gerbil on low and high-energy diets. **Biol Neonate**, v. 90, p. 58–65, 2006.

PERCARIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. **Rev Nutr**, v. 23, n. 2, p. 259-267, 2010.

PETERSON, R.G.; NEEL, M.A.; LITTLE, L.A.; KINCAID, J.C.; EICHBERG, J. **Neuropathic complications in the Zucker diabetic fatty rat**. Shafir E eds. *Frontiers in Diabetic Research: Lessons from Animal Diabetes III*. Smith-Gordon, London.: p. 456-458, 1990.

PETROPOULOS, S.; GUILLEMIN, C.; ERGAZ, Z.; DIMOV, S.; SUDERMAN, M.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ORNOY, A.; SZYF, M. Gestational Diabetes Alters Offspring DNA Methylation Profiles in Human and Rat: Identification of Key Pathways Involved in Endocrine System Disorders, Insulin Signaling, Diabetes Signaling, and ILK Signaling. **Endocrinol**, v. 156, n. 6, p. 2222-2238, 2015.

PETRY, A.; DJORDJEVIC, T.; WEITNAUER, M.; KIETZMANN, T.; HESS, J.; GÖRLACH, A. NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1473-84, 2006.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem**, v. 30, p. 11-26, 2015.

PICIUCCHI, M.; CAPURSO, G.; ARCHIBUGI, L.; FAVE, M.M.D.; CAPASSO, M.; FAVE, G.D. Exocrine Pancreatic Insufficiency in Diabetic Patients: Prevalence, Mechanisms, and Treatment. **International Journal of Endocrinology**, v.2015, p.1-7, 2015.

PIEME, C.A.; TATANGMO, J.A.; SIMO, G.; BIAPA, NYA PC, AMA MOOR VJ, MOUKETTE MOUKETTE B, ET AL. Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes. **BMC Res Notes**, v. 10, n. 141, p. 1-20, 2017.

PIWKOWSKA, A.; ROGACKA, D.; AUDZEYENKA, I.; JANKOWSKI, M.; ANGIELSKI, S. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 6, p. 1661–1672, 2011.

POLAK, M.; CAVÉ, H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. **Orphanet J Rare Dis**, p. 1-28, 2007.

POLYAKOVA, V.; HEIN, S.; KOSTIN, S.; ZIEGELHOEFFER, T.; SCHAPER, J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. **J Am Coll Cardiol**, v. 44, p. 1609-18, 2004.

POMPELLA, A.; CORTI, A. Editorial: the changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Front Pharmacol**, v. 6, n. 98, p. 1499-503, 2015.

PORTHA, B.; LEVACHER, C.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**, v. 23, n. 11, p. 889–895, 1974.

PORTO, N.P.; JUCÁ, D.M.; LAHLOU, S.; COELHO-DE-SOUZA, N.A.; DUARTE, G.P.; MAGALHÃES, P.J. Effects of K⁺channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 118, n. 6, p. 360-3, 2010.

POWERS, C.M. The influence of abnormal hip mechanics on knee injury: a biomechanical perspective. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 40, n. 2, p. 42–51, 2010.

POWERS, S.K.; NELSON, W.B.; HUDSON, M.B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 942–950, 2011.

PRIEST, J.R.; YANG, W.; REAVEN, G.; KNOWLES, J.W.; SHAW, G.M. Maternal Midpregnancy Glucose Levels and Risk of Congenital Heart Disease in Offspring. **JAMA Pediatr**, v. 169, n. 12, p. 1112-6, 2015.

PRIETO-BERMEJO, R.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, A. The Importance of NADPH Oxidases and Redox Signaling in Angiogenesis. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 6, p. 1-53, 2017.

PUSHPARAJ, P.; TAN, C.H.; TAN, B.K.H. Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 12, p. 69-76, 2000.

RABÊLO, L.A.; SOUZA, V.N.; FONSECA, L.J.S.; SAMPAIO, W.O. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 684-693, 2010.

RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1243, p. 88–102, 2011.

RAMASAMY, R.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 3, p. 505–512, 2009.

RAMOS-ALVES, F.E.; DE QUEIROZ, D.B.; SANTOS-ROCHA, J.; DUARTE, G.P.; XAVIER, F.E. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the

hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. **PLoSOne**, v. 7, n. 11, p. 1-9, 2012a.

RAMOS-ALVES, F.E.; DE QUEIROZ, D.B.; SANTOS-ROCHA, J.; DUARTE, G.P.; XAVIER, F.E. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **Br J Pharmacol**, v. 166, n. 7; p. 2198-2208, 2012b.

RAWSHANI, A.; RAWSHANI, A.; FRANZEN, S.; ELIASSON, B.; SVENSSON, A-M.; MIFTARAJ, M. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. **N Engl J Med**, v. 376, p. 1407-18, 2017.

RAZA, H, JOHN, A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 20, p. 72-8, 2004.

REDDY, M.A.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. **Cardiovasc Res**, v. 90, p. 1-35, 2011.

REICHELT, A.J.; SPICHLER, E.R.; BRANCHTEIN, L.; NUCCI, L.B.; FRANCO, L.J.; SCHMIDT, M.I. Fasting plasma glucose is a useful test for the detection of gestational diabetes. Brazilian Study of Gestational Diabetes (EBDG) Working Group. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 21, p. 1246-9, 1998.

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

REINKING B. E.; WEDEMEYER E. W.; WEISS R. M.; SEGAR J.L.; SCHOLZ T. D. Cardiomyopathy in offspring of diabetic rats is associated with activation of the MAPK and apoptotic pathways. **Cardiovasc Diabetol**, v. 8, p. 43, 2009.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacol Rev**, v. 22, p. 485-518, 1970.

REY, F.E.; CIFUENTES, M.E.; KIARASH, A.; QUINN, M.T.; PAGANO, P.J. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. **Circ Res**, v. 89, p. 408-14, 2001.

RIBEIRO, C.B. **Análise quimiometabólica e biomolecular da musculatura esquelética de ratos submetidos ao tratamento com aminoácido**. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2010.

ROCHA, S.O.; GOMES, G.N.; FORTI, A.L.; DO CARMO PINHO FRANCO, M.; FORTES, Z.B.; DE FÁTIMA CAVANAL, M.; GIL, F.Z. Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. **Pediatr Res**, v. 58, p. 1274-1279, 2005.

ROSAMOND, W.D.; CHAMBLESS, L.E.; FOLSOM, A.R.; COOPER, L.S.; CONWILL, D.E.; CLEGG, L. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. **N Engl J Med**, v. 339, p. 861-7, 1998.

RUDGE, M.V.; LIMA, C.P.; DAMASCENO, D.C.; SINZATO, Y.K.; NAPOLI, G.; RUDGE, C.V.C.; GALLEGOS, F.Q.; CALDERON, I.M.P. Histopathological placental lesions in mild gestational hyperglycemic and diabetic women. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2011.

RUDGE, M.V.C.; DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; ALMEIDA, F.C.; CALDERON, I.M.; LEMONICA, I.P. Effect of *Ginkgo biloba* on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 8, p. 1095-9, 2007.

RYAN, E. A.; LIU, D.; BELL, R.C.; FINEGOOD, D.T.; CRAWFORD, J. Long term consequences in offspring of diabetes in pregnancy: studies with syngeneic islet-transplanted streptozotocin-diabetic rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5587-92, 1995.

SALLES, J. E. N.; KALININ, L. B.; FERREIRA, S. R. G.; KASAMATSU, T.; MOISÉS, R. S. Diabetes Mellitus Associado à Muta  o Mitocondrial A3243G: Freq  ncia e Caracteriza  o Clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.51, n.4, p.559-565, 2007.

SAN MARTIN, A.; DU, P.; DIKALOVA, A.; LASSEGUE, B.; ALEMAN, M.; GONGORA, M.C. Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, p. H2073-82, 2007.

SANTOS, G.M.R.F. **Diabetes gestacional: consequências sobre a pressão arterial média e produtos avançados de oxida  o proteica em ratos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enfermagem) – Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, 2011.

SARWAR, N.; GAO, P.; SESHASAI, S.R.K.; GOBIN, R.; KAPTOGE, S. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2215–2222, 2010.

SBD, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, p. 1-348, 2016.

SCHAAN, B.D.; DALL’AGO, P.; MAEDA, C.Y.; FERLIN, E.; FERNANDES, T.G.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M.C. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Braz J Med Biol Res**, v 37, n. 12, p. 1895-902, 2004.

SCHAAN, B.D; LACCHINI, S.; BERTOLUCI, M.C.; IRIGOYEN, M.C.; MACHADO, U.F.; SCHMID, H. Increased renal GLUT 1 abundance, albuminuria and urinary TGF-beta1 in STZ-induced diabetic rats: implications for the development of diabetic nephropathy (DN). **Horm Metab Res**, v. 33, p. 664-669, 2001.

SCHEIN, P.S.; LOFTUS, S. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. **Cancer Res**, v. 28, p. 1501–1506, 1968.

SHIBA, T.; INOBUCHI, T.; SPORTSMAN, J.R.; HEATH, W.F.; BURSELL, S.; KING, G.L. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. **Am J Physiol**, v. 265, p. 783-793, 1993.

SCHMIDT, R.E.; DORSEY, D.A.; BEAUDET, L.N.; PETERSON, R.G. Analysis of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) type 2 diabetic rat model suggests a neurotrophic role for insulin/IGF-I in diabetic autonomic neuropathy. **Am J Pathol**, v. 163, p. 21-8, 2003.

SCHMITT, M.L.; RIBEIRO, S.L.; PAES, M.A.S.; RIBEIRO, R.M. Prevalência de diabetes gestacional no município de São Joaquim – SC. **RBAC**, v. 41, n. 1, p. 43-45, 2009.

SCHÖDER, K.; ZHANG, M.; BENKHOFF, S.; MIETH, A.; PLIQUETT, R.; KOSOWSKI, J.; KRUSE, C.; LUEDIKE, P.; MICHAELIS, U.R.; WEISSMAN, N.; DIMMELER, S.; SHAH, A.M.; BRANDES, R.P. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. **Circ Res**, v. 110, n. 9, p. 1217-25, 2012.

SCHOFIELD, J.D.; LIU, Y.; RAO-BALAKRISHNA, P. Diabetes dyslipidemia. **Diabetes Ther**, v. 7, p. 1-35, 2016.

SCHRAENEN, A.; LEMAIRE, K.; DE FAUDEUR, G.; HENDRICKX, N.; GRANVIK, M.; VAN LOMMEL, L.; MALLET, J.; VODJDANI, G.; GILON, P.; BINART, N.; IN'T VELD, P.; SCHUIT, F. Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. **Diabetologia**, v. 53, p. 2589–2599, 2010.

SEDEEK, M.; CALLERA, G.; MONTEZANO, A.; GUTSOL, A.; HEITZ, F. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 299, n. 6, p. F1348-58, 2010.

SEDEEK, M.; MONTEZANO, A.C.; HEBERT, R.L.; GRAY, S.P.; DI MARCO, E.; JHA, J.C. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 5, p. 509-18, 2012.

SEGAR, E.M.; NORRIS, A.W.; YAO, J.R.; HU, S.; KOPPENHAFFER, S.L.; ROGHAIR, R.D.; SEGAR, J.L.; SCHOLZ, T.D. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. **Clin Sci**, v. 117, p. 129–138, 2009.

SELVIN, E.; CORESH, J.; HALUSHKA, M.K. sRAGE risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. **Diabetes**, v. 62, p. 2116-2121, 2013.

SEYMOUR, E.M.; BENNINK, M.R.; WATTS, S.W.; BOLLING, S.F. Whole grape intake impacts cardiac peroxisome proliferator-activated receptor and nuclear factor kappaB activity and cytokine expression in rats with diastolic dysfunction. **Hypertens**, v. 55, p. 1179-85, 2010.

SFERRUZZI-PERRI, A. N.; OWENS, J.A.; PRINGLE., K.G.; ROBERTS, C.T. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. **J Physiol**, v. 1, n. 589, p. 1-25, 2011.

SHAH, V.O.; DORIN, R.L.; SUN, Y.; BRAUN, M.; ZAGER, P.G. Aldose reductase expression is increased in diabetic nephropathy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 2294–2298, 1997.

SHAFRIR, E.; BARASH, V. Placental function in maternal-fetal fat transport in diabetes. **Biol Neonate**, v. 51, p. 102-12, 1987.

SHARMA, G.; WILSON, K.; VAN DER WALLE, C.F.; SATTAR, N. PETRIE, J.R.; RAVI KUMAR, M.N.V. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 76, n. 2, p. 159–169, 2010.

SHARPE, P.C.; LIU, W-H.; YUE, K.K.; MCMASTER, D.; CATHERWOOD, M.A.; MCGINTY, A.M.; TRIMBLE, E.R. Glucose induced oxidative stress in vascular contractile cells. **Diabetes**, v. 47, p. 801–809, 1998.

SHEN, G.X. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 88, p. 241-8, 2010.

SHIOSE, A.; KURODA, J.; TSURUYA, K.; HIRAI, M.; HIRAKATA, H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 1417–1423, 2001.

SILVA, A. M. O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T.; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos1. **Rev Nutr**, v. 24, n. 1, p. 121-130, 2011.

SILVA, C.O., DA SILVA, O.,A., DUARTE, G.P., DESCOMPS, B., LAHLOU, S. Apocynin decreases AGEs-induced stimulation of NF-κB protein expression in vascular smooth muscle cells from GK rats. **Pharm Biol**, v. 53, p. 448-93, 2015.

SIMARD, E.; SOLLRADL, T.; MALTAIS, J.S.; BOUCHER, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; GRANDBOIS, M. Receptor for Advanced Glycation End-Products Signaling Interferes with the Vascular Smooth Muscle Cell Contractile Phenotype and Function. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. 1-40, 2015.

SINZATO, Y.K.; LIMA, P.H.O.; CAMPOS, K.E.; KISS, A.C.I.; RUDGE, M.V.C.; DAMASCENO, D.C. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 4, p. 384-388, 2009.

SIVAN, E.; LEE, Y.C.; WU, Y.K.; REECE, E.A. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. **Teratology**, v. 56, p. 343-9, 1997.

SIVITZ, W. I.; YOREK, M. A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.12, n.4, p.537-577, 2010.

SIWIK, D.A.; PAGANO, P.J.; COLUCCI, W.S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, p. C53-60, 2001.

SONE, H.; TAKAHASHI, A.; IIDA, K.; YAMADA, N. Disease model: Hyperinsulinemia and insulin resistance. Part B polygenic and other animal models. **Trends Mol Med**, v. 7, p. 373-6, 2001.

SONG, X-Q.; LV, L-X.; LI, W-Q.; HAO, Y-H.; ZHAO, J-P. The interaction of nuclear factor-kappa B and cytokines is associated with schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 65, p. 481-8, 2009.

SORCI, G.; RIUZZI, F.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 1, p. 101–109, 2013.

SORO-PAAVONEN, A.; WATSON, A.M.D.; LI, J.; PAAVONEN, K.; KOITKA, A.; CALKIN, A.C. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. **Diabetes**, v. 57, p. 2461-9, 2008.

SOSENKO, I.R.; FRANK, L. Lung development in the streptozotocin rat fetus: antioxidant enzymes and survival in high oxygen. **Pediatr Res**, v. 20, p. 67-70, 1986.

SPINAS, G.A. The dual role of nitric oxide in islets β -cells. **News Physiol Sci**, v. 14, p. 49-54, 1999.

STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J.D.; WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes care**, v. 16, n. 2, p. 434–444, 1993.

STAUFFACHER, W.; BURR, I.; GUTZEIT, I.; BEAVEN, D.; VELEMINSKY, J.; RENOLD, A.E. Streptozotocin diabetes: time course of irreversible β -cell damage; further observations on prevention by nicotinamide. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 133, p. 194–200, 1970.

STEINBERG, S.F. Structural basis of protein kinase C isoform function. **Physiol Rev**, v. 88, p. 1341–1378, 2008.

STONE, J.R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 3–4, p. 243–270, 2006.

STONE, V.; AUGUST, P.M.; STOCHER, D.P.; KLEIN, C.P.; COUTO, P.R.G.; SILVA, Y.D. Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. **Free Radic Res**, v. 50, p. 530–41, 2016.

STREETER, J.; THIEL, W.; BRIEGER, K.; MILLER, F.J.JR. Opportunity nox: the future of NADPH oxidases as therapeutic targets in cardiovascular disease. **Cardiovasc Ther**, v. 31, n. 3, p. 125–137, 2013.

STURROCK, A.; CAHILL, B.; NORMAN, K.; HUECKSTEADT, T.P.; HILL, K. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290, n. 4, p. L661–L673, 2006.

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

TAGUCHI, A.; BLOOD, D.C. DEL TORO, G.; CANET, A.; LEE, D.C. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 354–360, 2000.

TAKAC, I.; SCHRÖDER, K.; ZHANG, L.; LARDY, B.; ANILKUMAR, N.; LAMBETH, J.D.; SHAH, A.M.; MOREL, F.; BRANDES, R.P. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. **J Biol Chem**, v. 286, p. 1-22, 2011.

TAKENOUCHI, Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUMOTO, K.; KAMATA. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. **Atherosclerosis**, v. 206, p. 397-404, 2009.

TEIXEIRA-SILVA, J.J. **Perfil metabólico e inflamatório da prole adulta oriunda de fêmeas expostas ao isoproterenol e a estreptozotocina**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

THANDAVARAYAN, R.A.; GIRIDHARAN, V.V.; SARI, F.R.; ARUMUGAM, S.; VEERAVEEDU, P.T.; PANDIAN, G.N. Depletion of 14-3-3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAPK/NF- κ B signaling pathways after streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Cell Physiol Biochem**, v. 28, p. 911-22, 2011.

THULESEN, J.; ORSKOV, C.; HOLST, J.J.; POULSEN, S.S. Shortterm insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-68, 1997.

TIAN, X.Y.; WONG, W.T.; XU, A.; CHEN, Z.Y.; LU, Y.; LIU, L.M. Rosuvastatin improves endothelial function in db/db mice: role of angiotensin II type 1 receptors and oxidative stress. **Br J Pharmacol**, v. 164, p. 598-606, 2011.

TONG, X.; HOU, X.; JOURD'HEUIL, D.; WEISBROD, R.M.; COHEN, R.A. Upregulation of Nox4 by TGF β 1 oxidizes SERCA and inhibits NO in arterial smooth muscle of the prediabetic Zucker rat. **Circ Res**, v. 107, n. 8, p. 975-83, 2010.

TONG, X.; SCHRODER, K. NADPH oxidases are responsible for the failure of nitric oxide to inhibit migration of smooth muscle cells exposed to high glucose. **Free Radical Biol Med**, v. 47, p. 1578–1583, 2009.

TOPCUOGLU, S., KARATEKIN G, YAVUZ T, ARMAN D, KAYA A, GURSOY T, OVALI F. The relationship between the oxidative stress and the cardiac hypertrophy in infants of diabetic mothers. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 109, n. 1, p. 104-109, 2015.

TOWLER, D.A. Vascular Calcification: It's All The RAGE. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 2, p. 237-239, 2011.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M.A.; RIVERA-DEL VALLE, N.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TSADOK, M.A.; FRIEDLANDER, Y.; PALTIEL, O.; MANOR, O.; MEINER, V.; HOCHNER, H.; SAGY, Y.; SHARON, N.; YAZDGERDI, S.; SISOVICK, D.; ELCHALAL, U. Obesity and blood pressure in 17-year-old offspring of mothers with gestational diabetes: insights from the Jerusalem perinatal study. **Exp Diabetes Res**, v. 2011, p. 1-15, 2011.

TSOPORIS, J.N.; IZHAR, S.; LEONG-POI, H.; DESJARDINS, J-F.; HUTTUNEN, H.J.; PARKER, T.G. S100B interaction with the receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel receptor-mediated mechanism for myocyte apoptosis postinfarction. **Circ Res**, v. 106, p. 93-101, 2010.

TSUJI, K. TSUURA, Y., ISHIDA, H., OKAMOTO, Y., TSUJI, K., KUROSE, T., HORIE, M., IMURA, H., OKADA, Y., SEINO, Y. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 37, n. 11, p. 1040–1044, 1988.

USHIO-FUKAI, M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. **Sci STKE**, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VALLADARES, C.G.; KONKA, S.B. Prevalência de diabetes mellitus gestacional em gestantes de um centro de saúde de Brasília – DF. **Com. Ciências Saúde**, v. 19, n. 1, p. 11-17, 2008.

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

VAN ASSCHE, F. A.; HOLEMANS, K.; AERTS, L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. **Br Med Bull**, v. 60, p. 173-82, 2001.

VAN HERPEN, N.A.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. **Physiol Behav**, v. 94, p. 231–241, 2008.

VANDERLAAN, P.A.; REARDON, C.A.; GETZ, G.S. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 12-22, 2004.

VASSY, J.; KRAEMER, M.; CHALUMEAU, M.T.; FOUCRIER, J. Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. **Cell Differ**, v. 24, p. 9-24, 1988.

VERCHEVAL, M.; DE HERTOOGH, R.; PAMPFER, S.; VANDERHEYDEN, I.; MICHIELS, B.; DE BERNARDI, P.; DE MEYER, R. Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. **Diabetologia**, v. 33, n. 4, p. 187-191, 1990.

VERGANI, L.; FLOREANIA, M.; RUSSELL, A.; CECCON, M.; NAPOLI, E.; CABRELLE, A.; VALENTE, L.; BRAGATINI, F.; LEGER, B.; DABBENI-SALA, F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. **Eur J Biochem**, v. 271, p. 3646–3656, 2004.

VESKOUKIS, A.S.; NIKOLAIDIS, M.G.; KYPAROS, A.; KOURETAS, D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. **Free Radic Biol Med**, v. 47, p. 1371-4, 2009.

VIBERTI, G. Increased capillary permeability in diabetes mellitus and its relationship to microvascular angiopathy. **Am J Med**, v. 146, p. 688–694, 1983.

VINIK, A. Diabetic Sensory and Motor Neuropathy. **N Engl J Med**, v. 374, p. 1455-1464, 2016.

VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.C.; RUDGE, M.V.; PADOVANI, C.R.; CALDERON, I.M. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v.116, n. 1, 2008.

WANG, S.; WANG, B.; WANG, Y.; TONG, Q.; LIU, Q.; SUN, J. Zinc Prevents the Development of Diabetic Cardiomyopathy in db/db Mice. **Int J Mol Sci**, v. 18, 2017.

WANG, Y.; ZHANG, H. Serum 25-Hydroxyvitamin D3 Levels Are Associated with Carotid Intima-Media Thickness and Carotid Atherosclerotic Plaque in Type 2 Diabetic Patients. **J Diabetes Res**, v. 2017, p. 1-22, 2017.

WANG, Z.; LI, L.; DU, R.; YAN, J.; LIU, N.; YUAN, W. CML/RAGE signal induces calcification cascade in diabetes. **Diabetol Metab Syndr**, v. 8, p. 1-13, 2016.

WAUTIER, M.P.; CHAPPEY, O.; CORDA, S.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M.; WAUTIER, J.L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 5, p. E685-94, 2001.

WAUTIER, M-P.; GUILLAUSSEAU, P-J.; WAUTIER, J-L. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. **Diabetes Metab Syndr**, p. 153-160, 2016.

WAUTIER, J.L.; ZOUKOURIAN, C.; CHAPPEY, O.; WAUTIER, M.P.; GUILLAUSSEAU, P.J. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hypermeability in diabetic rats. **J Clin Invest**, v. 97, n. 1, p. 238-43, 1996.

WEBER, K.T. Targeting pathological remodeling - Concepts of cardioprotection and reparation. **Circulation**, v. 102, n. 12, p. 1342-5, 2000.

WEI, X.F.; ZHOU, Q.G.; HOU, F.F.; LIU, B.Y.; LIANG, M. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, p. 427-37, 2009.

WEISS, U.; CERVAR, M.; PUERSTNER, P.; SCHMUT, O.; HAAS, J.; MAUSCHITZ, R. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. **Diabetologia**, v. 44, p. 209-19, 2001.

WENDT, M.C.; DAIBER, A.; KLESCHYOV, A.L.; MULSCH, A.; SYDOW, K.; SCHULZ, E. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 381-91, 2005.

WENDT, M.C.; DAIBER, A.; KLESCHYOV, A.L.; MULSCH, A.; SYDOW, K.; SCHULZ, E. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 381-91, 2005.

WEST, N.A.; CRUME, T.L.; MALIGIE, M.A.; DABELEA, D. Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. **Diabetologia**, v. 54, n. 3, p. 1-11, 2011.

WEZÁR, F. 1964. The stages and consequences of aging of collagen. **Gerontologia**, v. 9, p. 209-221, 1964.

WHO, World Health Organization, **NCD Country Profiles**. 2011.

WHO, World Health **Organization. Definition**, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. WHO, 1999.

WHO, World Health Organization. **Global Report on Diabetes**. 2016.

WICHI, R.B.; SOUZA, S.B.; CASARINI, D.E.; IRIGOYEN, M.C. Fetal Physiological Programming Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, p. 1129-1133, 2005.

WIDDOWSON, E. M.; MCCANCE, R. A. A review: new thoughts on growth. **Pediatr. Res.**, v. 9, p. 154–156, 1975.

WILSON, C. Cardiovascular endocrinology: RAGE--a biomarker for CHD in T2DM? **Nat. Rev. Endocrinol**, v. 7, n. 10, p. 561, 2011.

WOLF, B.A.; WILLIAMSON, J.R.; EASOM, R.A.; CHANG, K.; SHERMAN, W.R.; TURK, J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. **J Clin Invest**, v. 87, p. 31–38, 1991.

WU, K.K.; HUAN, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 5, n. 5, p. 547-549, 2008.

WU, X.; WILLIAMS, K.J. NOX4 pathway as a source of selective insulin resistance and responsiveness. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 5, p. 1236–1245, 2012.

XI, G.; SHEN, X.; MAILE, L.A.; WAI, C.; GOLLAHON, K.; CLEMMONS, D.R. Hyperglycemia enhances IGF-I-stimulated Src activation via increasing Nox4-derived reactive oxygen species in a PKC ζ -dependent manner in vascular smooth muscle cells. **Diabetes**, v. 61, p. 104-13, 2012.

- XIA, P.; INOBUCHI, T.; KERN, T.S.; ENGERMAN, R.L.; OATES, P.J.; KING, G.L. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. **Diabetes**, v. 43, p. 1122–1129, 1994.
- XIE, J.; REVERDATTO, S.; FROLOV, A.; HOFFMANN, R.; BURZ, D.S.; SHEKHTMAN, A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **J. Biol. Chem**, v. 283, n. 40, p. 27255–27269, 2008.
- YAMAGISHI, S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. **Exp. Gerontol**, v. 46, n. 4, p. 217–224, 2011.
- YAMAGISHI, S-I.; NAKAMURA, N.; MATSUI, T. Glycation and cardiovascular disease in diabetes: A perspective on the concept of metabolic memory. **J Diabetes**, v. 9, p. 141-8, 2017.
- YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H. Controlling the receptor for advanced glycation end-products to conquer diabetic vascular complications. **J Diabetes Investig**, v. 3, n. 2, p. 107-114, 2012.
- YAN, H.; HARDING, J.J. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. **Biochem J**, v. 328, p. 599-605, 1997.
- YAN, L-J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **J Diabetes Res**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- YAN, S.D.; CHEN, X.; FU, J.; CHEN, M.; ZHU, H. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 685–691, 1996.
- YAN, S.F.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A.M. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. **Circ Res**, v. 106, n. 5, p. 842–853, 2010.
- YANG, H.; WRIGHT, J.R. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. **Endocrinology**, v.143, p.2491-2495, 2002.
- YAU, J.W.Y.; ROGERS, S.L.; KAWASAKI, R.; LAMOUREUX, E.L.; KOWALSKI, J.W.; BEK, T. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care**, v. 35, p. 556-64, 2012.
- YESSOUFOU, A.; SOULAIMANN, N.; MERZOUK, S.A.; MOUTAIROU, K.; AHISSOU, H.; PROST, J.; SIMONIN, A.M.; MERZOUK, H.; HICHAMI, A.; KHAN, N.A. N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. **Int J Obes** v. 30, n. 5, p. 739-50, 2006.
- YOKOYAMA, M.; INOUE, N. How vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression are regulated. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 1540-1542, 2004.
- YU, H.; ZHEN, J.; PANG, B.; GU, J.; WU, S. Ginsenoside Rg1 ameliorates oxidative stress and myocardial apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 16, p. 344-54, 2015.

ZAFAR, M.; NAQVI, S.N.; AHMED, M.; KAIMKHANI, Z.A. Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. **Int J Morphol**, v. 27, n. 3, p. 719-725, 2009.

ZANGEN, S.W.; YAFFE, P.; SHECHTMAN, S.; ZANGEN, D.H.; RNOY, A. The role of reactive oxygen species in diabetes-induced anomalies in embryos of Cohen diabetic rats. **Int J Exp Diabetes Res**, v. 3, n. 4, p. 247-255, 2002.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZEMSE, S.M.; HILGERS, R.H.; WEBB, R.C. Interleukin-10 counteracts impaired endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II in murine aortic rings. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, p. H3103-H3108, 2007.

ZHANG, C.; YI, F.; XIA, M.; BOINI, K.M.; ZHU, Q. NMDA receptor-mediated activation of NADPH oxidase and glomerulosclerosis in hyperhomocysteinemic rats. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 7, p. 975-986, 2010.

ZHANG, M.; BREWE, A.C.; SCHRÖDER, K.; SANTOS, C.X.; GRIEVE, D.J.; WANG, M.; ANILKUMAR, N.; YU, B.; DONG, X.; WALKER, S.J.; BRANDES, R.P.; SHAH, A.M. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 42, 2010.

ZHANG, M.; PERINO, A.; GHIGO, A.; HIRSCH, E.; SHAH, A.M. NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers? **Antioxid Redox Signal**, v. 8=18, n. 9, p. 1024-33, 2013

ZHANG, Q.; DENG, Y.; LAI, W.; GUAN, X.; SUN, X.; HAN, Q. Maternal inflammation activated ROS-p38 MAPK predisposes offspring to heart damages caused by isoproterenol via augmenting ROS generation. **Sci Rep**, v. 6, p. 1-16, 2016.

ZHANG, X.; STRAKOVSKY, R.; ZHOU, D.; ZHANG, Y.; PAN, Y-X. A maternal high-fat diet represses the expression of antioxidant defense genes and induces the cellular senescence pathway in the liver of male offspring rats. **J Nutr**, v. 141, p. 1254-9, 2011.

ZHAO, Q.D.; VISWANADHAPALLI, S.; WILLIAMS, P.; SHI, Q.; TAN, C.; YI, X. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFkappaB signaling pathways. **Circulation**, v. 131, p. 643-55, 2015.

ZUCKER, L.M.; ZUCKER, T.F. Fatty, a new mutation in the rat, **Journal of Heredity**, v. 52, n. 6, p. 275-278, 1961.

APÊNDICE A - ARTIGO

Manuscript for Submission to the *Journal of Diabetes Research*

RAGE and oxidative stress participate in the long-term cardiovascular effects on offspring of streptozotocin induced diabetic mothers

Authors

Geórgia Maria Ricardo Félix dos Santos¹, José Jairo Teixeira da Silva¹, Ivson Bezerra da Silva¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior², Eduardo Carvalho Lira¹, Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves³, Cristina de Oliveira Silva⁴, Glória Isolina Boente Pinto Duarte¹

Author Affiliations

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Núcleo de Ciências Biológicas, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – CAV/UFPE, Rua Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP, Avenida Prof. Lineu Prestes 2415, Cidade Universitária, 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – CAV/UFPE, Rua Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

***Corresponding author:** Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Tel: (81) 2126-8000

Email: duarte.gloria@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of intrauterine exposure to hyperglycemia (> 350 mg/ dL) induced by streptozotocin (50 mg/kg), AGEs-RAGE pathways and oxidative stress in aorta and heart from offspring at 3, 6, 12 and 18 months old. Exposure to the hyperglycaemic intrauterine environment promoted a significant increase in triglyceride levels, glucose intolerance as well as hepatic glycogen reduction. In thoracic aorta, no significant differences was observed in the protein expression of RAGE and Nox4. In the heart, at 12 and 18 months of age, increased protein expression of RAGE and Nox4, increased oxidative stress and reduced antioxidant defenses were observed. In addition, reduction of capillary density as well as increased collagen volume fraction was also observed in the diabetic offspring at 18 months of age. Intrauterine exposure to hyperglycemia induced disorders in glycemic and lipid metabolism and suggest that the participation of the RAGE-Nox4-ROS pathway and the redox imbalance are variable between the aortic and cardiac tissues. In addition, the age of the animal constitutes a factor key to the appearance of cardiovascular changes.

Keywords: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, offspring, oxidative stress.

INTRODUCTION

Clinical, epidemiological and histopathologic evidences provide support for the “fetal programming theory”, which suggests that stimulus, such as gestational diabetes, that occurs during a critical window of development can leading in permanent alterations on the structure or function of organs and tissues on both cellular and molecular levels, predisposing the offspring to chronic diseases later in life [1,2]. Previous studies have shown that hyperglycemia, with consequent increase in advanced glycation end products (AGEs), is considered the key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications [3].

The formation of AGEs results from glycation and non-enzymatic oxidation of proteins and lipids. One of the ways in which AGEs exert their pathological effects is the interaction with the receptor for AGEs (RAGE). RAGE, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on the surface of endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages, monocytes, lymphocytes and fibroblasts under physiological conditions. However, factors such as hyperglycemia, hyperlipidemia and inflammation increase the expression of RAGE [4]. The AGEs-RAGE interaction activates several signaling cascades that promote the increase of oxidative stress with the production of reactive oxygen species (ROS) by the activation of NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase and subsequent stimulation of nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) involved in the regulation of genes related to cell differentiation, apoptosis, as well as immune and inflammatory responses [5,6].

The factor common to all these stimuli is oxidative stress, which promotes the increase of ROS. Antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione) represent the body's first line of defense against increased ROS. The protective threshold is directly related to the function and equilibrium of these enzymes [7]. The mitochondria of the cardiomyocytes constitute the major source of superoxide radicals, especially in the complexes I and III of the electron transport chain [8]. Superoxide dismutase catalyzes the dismutation of superoxide radicals in hydrogen peroxide (H_2O_2). Catalase, a protein located in peroxisome, catalyzes the reduction of H_2O_2 in oxygen and water [7]. As myocytes have few peroxisomes, the catalytic activity of the catalase in the heart is only $\sim 2\%$ when compared to the liver of humans and rodents [9,10], which makes the cells of the heart more susceptible to oxidative stress. Glutathione also reduces H_2O_2 to water and acts as a cosubstrate for the activity of glutathione peroxidase (GPx) [7].

The enzymatic complex of NADPH oxidase (Nox), stands out as one of the largest producers of ROS in patients and diabetic animals [11]. Among its main isoforms is the Nox4 [20]. Nox4 is constitutively active being predominantly expressed in the cardiovascular system and associated with the pathogenesis and development of micro and macrovascular complications of diabetes, such as retinopathy, nephropathy and diabetic cardiomyopathy [12].

Studies in our laboratory has shown that resistance mesenteric arteries (MRA), from offspring at 6 and 12 months-old exposed to gestational diabetes, have a hyperreactive response to noradrenaline [13,14]. In addition, the activity of sympathetic and nitrgic innervation is increased in MRA, which could contribute to arterial hypertension [15]. Furthermore, previous results suggest a reduction in cholinergic vasorelaxant activity in aortas from these offspring [16]. In the present study, we investigated the time-dependent contribution of oxidative stress and receptor to AGEs (RAGE) in the development of cardiovascular complications in the offspring of diabetic rats induced by streptozotocin.

MATERIALS AND METHODS

Animal experimentation

Experiments were performed in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the colony maintained at the animal house facility of the Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Animals were housed in transparent plastic cages (36.5/21.5/18.5cm) on a 12/12-h light/ dark photoperiod. Food and water was available *ad libitum* and the room was temperature controlled at 22 ± 2 °C. All experiments were conducted in accordance with the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institute of Health (NIH Publications 85-23, revised 1996) and were approved by the Universidade Federal de Pernambuco Animal Research Ethics Board (Process 23076.011857 / 2014-81).

Induction of streptozotocin diabetes in pregnant rats

Females aged three months and weighing between 230-250g (n = 20) were used in this study. Gestational diabetes was induced on the 7th day of gestation by a single intraperitoneal injection of a buffered (0.01 M citrate pH 4.5) solution of streptozotocin (Sigma Chem. Co.,

St Louis, USA) at a dose of 50mg/ kg body weight. The animals were considered diabetic if their glycemia values were above 200mg/ dL on the 14th day of STZ injection. Control pregnant rats were treated with buffer only. After delivery, offspring was divided into two groups: offspring of control dams (OCR) and offspring of diabetic dams (ODR) and were studied from birth to 3, 6, 12 and 18 months of age. Only the offspring of males were used in the experiments.

Determination of glycemic homeostasis

To confirm the changes in glucose metabolism, the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) was performed. After an overnight fast (12-hour), animals were anesthetized with intraperitoneal injection of the sodium pentobarbital (50 mg/ kg) and a single intraperitoneal injection of the glucose solution (2 g/kg) was delivered. Blood samples were collected from the tail vein just before for determination of fasting glycaemia (time 0) and 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after glucose injection using test strips and reader (Optium mini®, Abbott, Chicago, USA).

Insulin tolerance test (ipITT)

After an overnight fast, a glucose tolerance test (ipITT) was performed to measure peripheral insulin resistance. Animals of both groups were anesthetized with intraperitoneal injection of the sodium pentobarbital (50 mg/ kg of body weight) and a single intraperitoneal injection (1.5 U/kg of body weight) of the Regular Insulin (Humulin® R, LillyFrance S.A.S., Fegersheim, France), was delivered. Blood samples were collected from the tail vein just before for determination of fasting glycaemia (time 0) and 5, 10, 15, 20, 30 minutes after glucose injection using test strips and reader (Optium mini®, Abbott, Chicago, USA). For insulin sensitivity, the first-order rate constant for glucose disappearance (k_{ITT}) was estimated from the slope of regression line of $\ln$ plasma glucose compared with time, according to the formula $k_{ITT} = \ln 2 / t_{1/2} \times 100$, at 0–30 minutes after delivery of the insulin bolus.

Biochemical parameters

After overnight fasting (12 h), the animals of both groups were anesthetized with intraperitoneal injection of the sodium pentobarbital (50 mg/ kg). Blood samples were collected from the retro-orbital sinus with a glass capillary, to determination of total cholesterol and fractions, triglycerides and serum glucose levels using commercial enzymatic kits (Labtest®). Plasma insulin levels of 18-months-old offspring were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa; Millipore®, Abacus AIS, Brisbane, Queensland, Australia).

Procedures for obtaining samples

All animals were euthanized under anesthesia (Sodium Pentobarbital, 50mg / kg of body weight). After thoracotomy, the heart of the offspring at age 12 and 18 months and the thoracic aorta from offspring at age 3, 6 and 12 months old were removed and washed, stored in cryogenic tubes and immersed in liquid nitrogen (196°C). The liver and the anterior tibial muscle from OCR and ODR at age 3, 6 and 12 months of life were removed for glycogen determination.

Determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent

Determination of glycogen in liver and muscle were assessed according to the method of the Carrol et al [16]. Tissue sample of the tibial anterior muscle and liver (500mg) at age 3, 6 and 12 months of life were assessed. The procedure involves digestion of tissue in boiling NaOH, deproteinization of the alkaline digest with benzoic acid and color production with anthrone reagent. The product of a reaction was determined using spectrophotometer at 620nm.

Oxidative Stress Markers Analysis

a) Preparation of tissue homogenate and protein quantitation

The heart of the offspring at age 12 and 18 months and the thoracic aorta of offspring at age 3, 6 and 12 months of life were assessed. Samples were homogenized with buffer (Tris-

Base + EDTA), pH 7.4 to obtain the supernatant and determination of the biomarkers of stress oxidative. Protein concentration was determined by Bradford et al. [17]. All assays were performed in duplicate.

b) Assessment of glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels

GSH and GSSG were assessed according to the method of the Hissin and Hilf [18] adapted, based on the reaction with o-phthalaldehyde. Fluorescence was measured in the microplate reader at 350nm excitation and 420nm emission. GSH and GSSG concentration of the samples was expressed as nanomoles per milligram (nanomol/ mg) of protein.

d) Evaluation of the production of nitric oxide

Nitrite levels were estimated using Griess's reagent, as described by Green et al. [19] adapted. The absorbance was measured in the microplate reader at 540nm. The results were expressed nanomoles per milligram (nmol/ mg) of protein.

e) Quantification of Reactive Oxygen Species (ROS)

The production of ROS was evaluated by the method of Nijimeh et al [20] adapted. The fluorescence of the DCF (2',7'-dichlorofluorescein) was measured in the microplate reader at 504nm excitation and 529nm emission. Values were expressed in units of fluorescence per milligram of protein (U/mg protein).

f) Catalase enzymatic activity

Catalase enzymatic activity was evaluated according to Aebi [21] adapted. The decomposition rate constant (k) was determined by measuring the absorbance changes at 10 seconds for 2,0 minutes at 240nm. The enzyme activity was expressed in units per milligram of protein (U/mg protein).

g) Superoxide dismutase activity

Evaluation of the superoxide dismutase enzymatic activity was performed according to Mishra and Fridovich [22] adapted. The absorbance was measured at 480nm for 2 minutes. A unit of SOD was defined as the amount of enzyme that causes 50% inhibition of epinephrine oxidation. The superoxide dismutase enzymatic activity in tissue was expressed in units per milligram of protein (U/mg protein).

Western blot analysis

Aortas samples in the offspring at age 3, 6, 12 months-old and the hearts samples from from offspring at age 12 and 18 months of life were homogenized in 800 μ L of lyses buffer (3M KCl, 1M Hepes, 1M MgCl_2^+) containing protease inhibitors (1mg/ml orthovanadate, 1mg/ml aprotinin, 1mg/ml leupeptin, 1mg/ml pepstatin, and 5m EDTA, 10% glycerol, 1M DTT, 10% SDS, pH 7.4) Protein concentration was determined by Bradford. Protein extracts (50 μ g) were separated by 10% SDS-PAGE gel electrophoresis (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide) and then transferred onto a PVDF (GE Healthcare) membrane. After blocking with 0,5% blotting grade milk, for 1h at room temperature. After washing with Tris Tween-20 Buffer (TBST) (0.05M Tris, 0.15M NaCl, pH 7.5 and 1% Tween-20), 3 times for 10 min at room temperature, the membranes were then incubated, with the following dilutions of primary antibody overnight at 4°C: anti-Nox-4 (1:500; Cell Signaling Technology) and anti-RAGE (1:500; Cell Signaling Technology). The membrana was then washed three times with TBST before being probed with either a horseradish peroxidase-conjugated anti-goat (for Nox4) and anti-rabbit (for RAGE). Protein signals were visualized using enhanced chemiluminescence reagentes and quantified by performing densitometry using ImageJ 1.44 Software (National [U1] Institutes of Health, USA and Chemi-Doc MP System-Bio-Rad Software. Anti-alpha-actinin (1:10.000) was used as control of the reaction for aortas and anti-GAPDH (1:10.000) as a control for the heart samples.

Quantitative Histomorphometry

Light microscopic quantification of collagen volume fraction (CVF) has previously been described and validated [23,24]. The histomorphometric analysis of the biopsy samples was performed on hematoxylin and eosin, and Picrosirius Red–stained 4- μ m-thick sections of tissue (± 15 sections of each sample). Images of these sections were acquired with a projection microscope. Subsequent image analysis with Imagej software was performed to determine

extent of reactive interstitial fibrosis, which was expressed as CVF (%). The cardiomyocytes (cmy) and cardiac interstitium (focusing on the capillary) was analyzed by light microscopy [25].

Statistical analysis

All results were expressed as means $\pm$ SEM values. Statistical analysis was performed using the unpaired Student's t test and two-way Anova (analysis of variance) when appropriate and the post-test of Bonferroni. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

Validation of the experimental model

Glucose levels were significantly elevated ($p < 0.001$) on day 14 after administration of STZ (410.0 ± 27.0 mg/dL, $n = 7$) when compared to the control females group (80.0 ± 1.5 mg/dL, $n = 7$). Polydipsia, polyphagia, polyuria, as well as, body weight reduction (data not shown) were also observed, confirming the DM. The length of gestation was similar between the experimental groups (data not show)

Effect of gestational diabetes on the body weight and the serum levels of biochemical parameters in the offspring 3, 6, 12 and 18 months of age

To avoid the possibility of rejection, only a few ($n = 8$) animals from diabetic rats (ODR) were weighed at birth. Body weight of pups were significantly ($p < 0.001$) lower in the offspring of diabetic dams compared to controls (5.7 ± 0.092 g vs. 6.5 ± 0.077 g, respectively).

The weight gain of offspring ODR at 3 and 6 months remained lower ($p < 0.001$, $p < 0.01$, respectively) compared to offspring OCR, as well as at 12 and 18 months of age ($p < 0.05$; $p < 0.05$, respectively).

ODR presented plasma triglyceride levels significantly ($p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively) higher compared to OCR. The levels of glucose, total cholesterol and HDL cholesterol did not differ between groups at 3, 6 and 12 months; however, at 18 months, plasma glucose and triglyceride levels were elevated when compared to OCR. The body

weight and the serum levels of biochemical parameters evaluated at 3, 6, 12 and 18 months of age is shown in Table 1.

Effect of gestational diabetes on the glucose tolerance tests (ipGTT) and on the insulin tolerance tests (ipITT) from offspring 3, 6, 12 and 18 months of age

At age 6 months, glycemic levels during ipGTT following i.p. of glucose was significantly higher ($p < 0.001$) in the ODR at 15 minutes of the test, as well as at age 12 months at 15 ($p < 0.01$) and 30 ($p < 0.05$) minutes, when compared to OCR. At age 18 months, glycemia remained greater at 30 and 60 minutes of the test (data not shown). These results were confirmed by calculation the area under the curve (data not shown). There were no significant differences in glycemia in the experimental groups at age 3, 6, 12 and 18 months in the insulin tolerance tests (ipITT) (data not shown). The area under the curve of the insulin tolerance tests (ipITT) and variation in insulin-sensitivity index (kITT) scores did not show statistically differences between the groups with 3, 6 and 12 months of age (data not shown). However, plasma insulin levels were reduced ($p < 0.01$) in 18-month-old animals compared to OCR (4.1 ± 0.41 OCR vs. 1.1 ± 0.16 ng/mL ODR, $n = 5$).

Effect of gestational diabetes on levels of liver glycogen and muscle glycogen in the offspring 3, 6 and 12 months of age

At age 6 and 12 months, levels hepatic glycogen (%) was significantly reduced ($p < 0.001$) in the ODR when compared to OCR (Table 2). However, no significant differences were observed in levels muscle glycogen (%) between the experimental groups at age 3, 6 and 12 months (Table 2) when compared to controls.

Effect of gestational diabetes on oxidative stress markers in aortas from offspring 3, 6 and 12 months of age and in heart from offspring 12 and 18 months of age

No significant differences were observed in reactive oxygen species (ROS) and nitrites production, from aorta ODR 3, 6 and 12 months of age when compared to their controls. The levels of antioxidant enzymes: glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), superoxide dismutase (SOD) activity and catalase (CAT) activity were similar.

In the heart from ODR 12 and 18 months of age, a decrease in nitrite levels was observed, increased ROS production, as well as reduction in GSH and GSSG levels. The SOD and CAT activity were also decreased in ODR when compared to OCR. The oxidative stress markers evaluated at 3, 6, 12 and 18 months of age is shown in Table 3.

Effect of gestational diabetes on RAGE and Nox4 expression in aortas from offspring 3, 6 and 12 months of age and in heart from offspring 12 and 18 months of age

The expression of RAGE protein and Nox 4 (Figure 1) were not significantly altered in aortas from the experimental groups at 3, 6 and 12 months of age.

In the heart of ODR at age 12 and 18 months, was observed an increase in protein expression of Nox4 and RAGE (Figure 2) when compared to OCR.

Capillary density and collagen volume fraction in heart of the offspring 18 months of age

In picrosirius red-stained sections, collagen volume fraction was higher ($p < 0.01$) in ODR (220.0 ± 32.0) than O-CR (100.0 ± 14.0). Additionally ODR (82.0 ± 4.4) showed capillary rarefaction ($p < 0.05$) when compared with OCR (100.0 ± 6.4) (Figure 3).

DISCUSSION

In the present study, we have investigated the possible mechanisms involved in the genesis and / or maintenance of oxidative stress by the activation of the RAGE and Nox4 in aorta and heart from exposed rats to gestational diabetes. The offspring from both groups were evaluated by metabolic parameters, such as glucose tolerance and insulin sensitivity, glycemic levels, lipid profile, hepatic and muscular glycogen, as well as oxidative stress and protein expression of RAGE and Nox4 in aorta and heart. The offspring studied here, exposed to the hyperglycemic environment, from the seventh day of gestation to the end of lactation, were born with low weight and thus maintained until adulthood. In rats, low birth weight is linked to the mother's glycemia levels, which when severely diabetic can generate fetuses with low body weight and / or malformed [26,27]. Thus, the findings of our study are in agreement with the literature and previous results of our team [26,27,29], since the offspring

came from mothers with glycemia ≥ 350 mg / dL. Canavan e Goldspink [28] believe that reduced fetal growth is associated with a decrease in protein synthesis.

Hypertriglyceridemia and glucose intolerance in offspring exposed to maternal hyperglycemia corroborates with the concept of fetal programming and suggests a pre-diabetes condition. Hypertriglyceridemia indicates metabolic dysfunction and increase of lipid peroxidation [29]. In the literature, there are differences in metabolic parameters of rats exposed to hyperglycemia [30,31]. This difference, probably, is due to the use of the ketamine anesthetic associated with xylazine that can alter glucose levels [32] and the insulin tolerance test [33]. This fact led us to choose of sodium pentobarbital, since it does not induce changes in plasma glucose and insulin levels [33].

The DG offspring did not present IR at all ages evaluated, indicating that peripheral glucose uptake and utilization by target tissues is inside of normal range. Together, these data suggest a compromise in insulin secretion, probably due to structural changes at pancreatic β -cell level.

It's possible that reduction of hepatic glycogen storage capacity as well as the glucose intolerance observed in our study from ODR at 6 and 12 months of age is thought to be related to changes in liver enzyme concentration as glucose-6-phosphatase, fructose-1-6-bisphosphate and hexokinase [34-36]. Additionally, histological damages and the increase in oxidative stress found in the liver would also have a role in the decrease of hepatic glycogen found from ODR [37,38]. It is important to note that the greater development of fetal liver volume and hepatocytes in Wistar rats occurs between the 13th and 20th day of gestation, in such a way it is ruled out a probability of the histological changes are caused by the administration of STZ on the 7th day of gestation [39]. Worth to be mentioned that muscular glycogen concentration from ODR was not affected by exposure to gestational diabetes, since the muscle lacks the enzyme glucose 6-phosphatase [40].

Chronic hyperglycemia plays a key role in the pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes, since it promotes the increase of AGEs and the RAGE receptor [3,4]. Our team previously verified an increase in plasma levels of AGEs in offspring exposed to maternal hyperglycemia at 4 months [41] as well as an increase in RAGE expression in cardiac tissue of offspring at 6 months of age, when compared to control offspring [37]. After this experiment, we decided to evaluate the protein expression of RAGE in the heart of DG offspring at 12 and 18 months of age.

In the present study there was a significant increase in RAGE expression in ODR heart at 12 and 18 months of age when compared to OCR. This result is very important, since the

expression of RAGE shows a strong relationship between exposure to hyperglycemia in the gestational period and the development of oxidative stress in adult life. To our knowledge, our study is the first to show the RAGE expression in the heart of offspring exposed to gestational diabetes in different ages. In the literature it is possible to find papers which also report increased RAGE expression in genetically modified knockout animals and in vitro studies using smooth muscle cells and culture of cardiomyocytes [42,43,44], but studies showing the RAGE expression increase in offspring are poor. Chandna et al. [45] observed that increased RAGE expression of RAGE altered normal hippocampal development and offspring behavior of diabetic rats. However, no articles were found demonstrating the protein RAGE expression in offspring's cardiovascular system from diabetic mothers in the studied ages. In diabetic patients, the increase of RAGE is associated with atherosclerosis and myocardial infarction [46-48].

There is evidence that ROS produced by NADPH oxidase appears to be a pathway commonly observed in hemodynamic and metabolic changes [49]. In our study the protein Nox4 expression was increased in heart of DG offspring at 12 and 18 months of age, when compared to ND offspring. However, the role of Nox4 in the development of cardiovascular complications is still controversial [50-53]. In fetal programming models, the Nox4 expression was increased, in offspring subjected to maternal inflammation from lipopolysaccharide (LPS) treated rats [54] and in mesenteric arteries of offspring from rats submitted to prenatal diet with high sucrose content [55].

The effects of Nox4-dependent signaling appear to be associated with the type of tissue / cell or stage of lesion development. The protein of Nox4 in the aorta did not differ between the gestational diabetes and control groups. However, the expression and function of Nox4 in vascular tissue are controversial [56,57], but some authors suggest the participation of Nox4 in diabetic atherosclerosis [58] and vasoprotective function [59,60].

The variation in the expression and location of Nox4 can be influenced by factors as experimental models, vascular beds studied, pressure inside the vessel, as well as the presence of growth factors, vasoactive and inflammatory [12]. Since the aorta does not contribute to peripheral resistance, vasoprotection is not likely to occur in other vascular beds, such as in vessels of resistance (mesenteric), where vasodilatory substances play important roles, and the proportion of endothelium to muscle cells is more extensive [61]. This may explain why in our study there was no change in the protein Nox4 expression in aorta of adult offspring, which corroborates with the previous results of our laboratory that did not find changes in vascular reactivity conductance arteries at 3 and 6 months of life (thoracic aorta) [15].

Using the same experimental model, Teixeira-Silva [37] demonstrated that offspring at 6 months of age exposed to maternal diabetes presented increased ROS levels in cardiac tissue, as well as decreased antioxidant enzymes levels. Following the Teixeira-Silva experiments, we evaluated the markers of cardiac oxidative stress in the offspring at 12 and 18 months of age, demonstrating a significant reduction in the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione, accompanied by increased levels of ROS and nitrite reduction in ODR heart at 12 and 18 months of age, compared to OCR. These data confirm the existence of a pro-oxidative tissue state, contributing to the development of cardiovascular complications. Experimental and clinical evidence demonstrates that ROS accumulation is associated with diabetes or obesity [62,63]. A possible explanation for the reduction of the activity or expression of superoxide dismutase and catalase would be inactivation or glycation of these enzymes [64] or excessive accumulation of the superoxide radical and H_2O_2 , which may produce the hydroxyl radical (OH), the main responsible for the lipid peroxidation of cell membranes [65]. In addition, increased H_2O_2 production may inactivate superoxide dismutase, as well as increased generation of superoxide radicals may also be responsible for decrease in catalase and glutathione peroxidase activities [66,67]. In relation to reduction of glutathione levels, this may be related as decreased synthesis or regeneration and / or increased lipid peroxidation, as observed by Raza and John [68] in the pancreas of diabetic rats and in the liver, kidney, brain of neonates from diabetic mothers induced by STZ (60mg / kg).

Previous studies have also reported reduced activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione and establishment of oxidative stress in the liver, kidney and heart of diabetic rats [69-71] and in the offspring of diabetic animals [72-75]. Reduction in the expression and activity of these enzymes were also observed in children of type 2 diabetic patients [76], as well as in the offspring of other experimental models [77-79].

Increased cardiac oxidative stress in the may lead to an increased contractile dysfunction of heart and risk to develop congestive heart failure (CHF) [80]. The ROS modulate the remodeling of the extracellular matrix and the function of cardiac fibroblasts, stimulating the collagen and matrix metalloproteinases activation, as well as the formation of cytokines [81].

In previous studies of our team, we observed that offspring at 4 months of age exposed to maternal hyperglycemia presented an increase in cardiac ventricular dry weight/body weight ratio of 15.7% and 22.44% of collagen fraction, with reduction in cardiomyocyte density, confirming the presence of hypertrophy and cardiac fibrosis, common in the tissue

repair process [82]. At 18 months, Da Silva [83] observed that cardiac hypertrophy in offspring exposed to maternal hyperglycemia not only persists in postnatal life, but also increases with age. In this context, we decided to evaluate the presence of cardiac fibrosis and capillary rarefaction in offspring DG at 18 months of age, since aging is related to increased rigidity and fibrosis, reduced contractility, increased ROS levels and endothelial dysfunction [84].

Our histological data revealed a large collagen deposition (2x greater) in the DG offspring heart, when compared to ND. It is well known that changes in the proportion, type and diameter of collagen fibers lead to effects on the mechanical heart properties [84]. The myocardial function affected by this process may increase the risk of ventricular arrhythmias, as well as the myocardial remodeling process, which is closely related to left ventricular dysfunction and sudden death [85]. In fact, our team demonstrated that at 4 [82], 12 and 18 [83] months of age, the offspring exposed to maternal hyperglycemia present a compromised β -adrenergic response in isolated heart preparations (Langendorff), accompanied by an increase in left ventricular systolic pressure and heart rate.

Regarding of capillary rarefaction found in DG offspring at 18 months of age, it may also be involved in the pathogenesis of myocardial dysfunction and demonstrates that intrauterine environment may exert influences on microcirculation remodeling. It is important to remember that oxidative stress induces capillary rarefaction is also an important risk factor for vascular calcification through the modulation of RAGE [86]. Increased ROS and reduced bioavailability of nitric oxide are considered the main factors responsible for capillary rarefaction in diabetes, as well as in hypertension [87,88]. As previously reported by our team, offspring from mothers with DG is hypertensive at 6 months of age [14] and remained hypertensive at 12 and 18 months [83].

CONCLUSION

In summary, this study demonstrated the activation of the RAGE and cardiac oxidative stress in the DG offspring heart at 12 and 18 months of age. According to our results, hyperglycemia increases the expression of RAGE leading to a higher formation of ROS, which acts as a positive feedback potentiating the activation of RAGE, since the increase of ROS derived from Nox4 can also increase the expression of RAGE. In this context, the inhibition of oxidative stress, which probably results from the activation of this pathway, may be one of the molecular mechanisms by which RAGE antioxidants and antagonists as well as

Nox inhibitors may constitute a potential therapeutic target for the prevention and treatment of diabetic metabolic and cardiovascular complications, such as cardiomyopathy. However, data of present study are still limited to explain the effects of gestational diabetes on offspring. Therefore, future studies involving the participation of other NADPH oxidase isoforms, NF- κ B, as well as the renin angiotensin system are necessary to substantiate our results and improve our knowledge on the mechanisms that relate maternal hyperglycemia and its consequences on offspring.

Conflict of interest: The authors confirm that there is no conflict of interests.

Acknowledgments: We would like to thank Mr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, Mr. Eduardo Carvalho Lira and Ms. Maria Luiza Moraes Barreto Chaves to contributed materials/analysis tools.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) Grant 1133-2.07/2012. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] Barker DJ, Fall CH. Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child* 1993;68(6):797-9
- [2] Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011;41(6):158-76.
- [3] Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep* 2014;14:453.
- [4] Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): A central player in the inflammatory response. *Microbes Infect* 2004;6(13):1219-25.
- [5] Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:63–80.
- [6] Koulis C, Watson AMD, Gray SP, Jandeleit-Dahm KA. Linking RAGE and Nox in diabetic micro- and macrovascular complications. *Diabetes Metab* 2015;41:272–81.
- [7] Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2012;12:5–18.
- [8] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24–38.
- [9] Cong W, Ruan D, Xuan Y, Niu C, Tao Y, Wang Y, et al. Cardiac-specific overexpression of catalase prevents diabetes-induced pathological changes by inhibiting NF-kappaB signaling activation in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2015;89:314–25.
- [10] Tung BT, Rodriguez-Bies E, Thanh HN, Le-Thi-Thu H, Navas P, Sanchez VM, et al. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clin Exp Res* 2015;27:775–83.
- [11] Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012;110:1364–90.
- [12] Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJR. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol* 2012;3:412.
- [13] Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One* 2012;7(11).
- [14] de Queiroz DB. Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno: contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua repercussão em diferentes idades. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- [15] Porto NP, Jucá DM, Lahlou S, Coelho-de-Souza NA, Duarte GP, Magalhães PJ. Effects of K⁺ channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118(6):360-3.

- [16] Carrol NV, Longley RW, Roe JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem* 1956; 220(2): 583-3.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [18] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74(1):214-26.
- [19] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-8.
- [20] Nijmeh J, Moldobaeva A and Wagner EM. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L535-41.
- [21] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- [22] Misra HP and Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972: 247:3170-5.
- [23] Giroix MH, Irminger JC, Lacraz G, Noll C, Calderari S, Ehses JA, Coulaud J, Cornut M, Kassis N, Schmidlin F, Paul JL, Kergoat M, Janel N, Halban PA, Homo-Delarche F. Hypercholesterolaemia, signs of islet microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki (GK) rat. *Diabetologia* 2011;54(9):2451-62.
- [24] Howard SG, Heindel JJ, Thayer KA, Porta M. Environmental pollutants and beta cell function: relevance for type 1 and gestational diabetes. *Diabetologia* 2011; 54(12):3168-3169.
- [25] Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46(1):3-19.
- [26] Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1991;34(2):81-5.
- [27] Ejdesjö A, Wentzel P, Eriksson UJ. Influence of maternal metabolism and parental genetics on fetal maldevelopment in diabetic rat pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(10):E1198-209.
- [28] Canavan JP, Goldspink DF. Maternal diabetes in rats. II. Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes* 1988;37:1671-1677.
- [29] Sinzato YK, Lima PHO, Campos KE, Kiss ACI, Rudge MVC, Damasceno DC. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Revista da Associação Medica Brasileira* 2009;55(4):384-388.
- [30] Blondeau B, Joly B, Perret C, Prince S, Bruneval P, Lelièvre-Pérgorier M, Fassot C, Duong Van Huyen JP. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. *Diabetes Metab* 2011;37(3):245-51.
- [31] Barbalho SM, Damasceno DC, Spada APM, Lima IEDRN, Araujo AC, Guiguer EL, Martuchi KA, Oshiiwa M, Mendes CG. Effects of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic Wistar rat offspring. *J Med Food* 2011;14:1490-5.

- [32] Ribeiro CB. Análise quimiometabólica e biomolecular da musculatura esquelética de ratos submetidos ao tratamento com aminoácido. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2010.
- [33] Guarino MP, Santos AL, Mota-Carmo M, Costa PF. Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. *In Vivo* 2013;27:127–132.
- [55] Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999; 13(3):295-309.
- [34] Liu Z, Barrett EJ, Dalkin AC, Zwart AD, Chou JY. Effect of acute diabetes on rat hepatic glucose-6-phosphatase activity and its messenger RNA level. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:680–6.
- [35] Pari L, Saravanan R. Antidiabetic effect of diasulin, a herbal drug, on blood glucose, plasma insulin and hepatic enzymes of glucose metabolism in hyperglycaemic rats. *Diabetes Obes Metab* 2004;6:286–92.
- [36] Segar EM, Norris AW, Yao JR, Hu S, Koppenhafer SL, Roghair RD, Segar JL, Scholz TD. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. *Clin Sci* 2009;117:129–138.
- [37] Teixeira-Silva JJ. perfil metabólico e inflamatório da prole adulta oriunda de fêmeas expostas ao isoproterenol e a estreptozotocina. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- [38] Lira EC, Santos GMRF, Teixeira-Silva, JJ, Duarte GIBP, Aguiar-Júnior FCA, Silva CO. Exposição ao diabetes gestacional: alterações sobre os parâmetros de estresse oxidativo e acúmulo de ferro esplênico em ratos. *Infarma Ciencias farmacêuticas* 2015; 27(4).
- [39] Vassy J, Kraemer M, Chalumeau MT, Foucrier J. Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Differ* 1988;24:9–24.
- [40] Aires MM. Fisiologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- [41] Santos GMRF. Diabetes gestacional: consequências sobre a pressão arterial média e produtos avançados de oxidação proteica em ratos. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enfermagem) – Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, 2011.
- [42] Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2002;106:2827–35.
- [43] Kang M-K, Chung W-B, Hong S-K, Kim O-R, Ihm S-H, Chang K, et al. Effects of candesartan cilexetil and amlodipine orotate on receptor for advanced glycation end products expression in the aortic wall of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OETF) type 2 diabetic rats. *Arch Pharm Res* 2016;39:565–76. doi:10.1007/s12272-016-0728-6.
- [44] Hou J, Zheng D, Fung G, Deng H, Chen L, Liang J. Mangiferin suppressed advanced glycation end products (AGEs) through NF-kappaB deactivation and displayed anti-inflammatory effects in streptozotocin and high fat diet-diabetic cardiomyopathy rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2016;94:332–40. doi:10.1139/cjpp-2015-0073.
- [45] Chandna AR, Kuhlmann N, Bryce CA, Greba Q, Campanucci VA, Howland JG. Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments

hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. *Neuroscience* 2015;303:241–60. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.063.

[46] Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, et al. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* 2003;108:1070–7.

[47] Falcone C, Bozzini S, Matrone B, Colonna A, Falcone R, Calcagnino M, et al. RAGE gene polymorphism in heart failure patients with and without angiographic evidence of significant coronary atherosclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013;26:199–206.

[48] Yamagishi S-I, Nakamura N, Matsui T. Glycation and cardiovascular disease in diabetes: A perspective on the concept of metabolic memory. *J Diabetes* 2017;9:141–8.

[49] Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:241–8.

[50] Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15565–70.

[51] Zhao QD, Viswanadhappalli S, Williams P, Shi Q, Tan C, Yi X, et al. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFkappaB signaling pathways. *Circulation* 2015;131:643–55.

[52] Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Park JY, Xie L-H, et al. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2013;112:651–63.

[53] Guo Z, Qi W, Yu Y, Du S, Wu J, Liu J. Effect of exenatide on the cardiac expression of adiponectin receptor 1 and NADPH oxidase subunits and heart function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:29.

[54] Zhang Q, Deng Y, Lai W, Guan X, Sun X, Han Q, et al. Maternal inflammation activated ROS-p38 MAPK predisposes offspring to heart damages caused by isoproterenol via augmenting ROS generation. *Sci Rep* 2016;6:30146.

[55] Feng X, Zhou X, Zhang W, Li X, He A, Liu B, et al. Maternal High-sucrose Diets Altered Vascular Large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channels via Reactive Oxygen Species in Offspring Ratsdagger. *Biol Reprod* 2017.

[56] Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, Mulsch A, Sydow K, Schulz E, et al. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med* 2005;39:381–91.

[57] Xi G, Shen X, Maile LA, Wai C, Gollahon K, Clemmons DR. Hyperglycemia enhances IGF-I-stimulated Src activation via increasing Nox4-derived reactive oxygen species in a PKCzeta-dependent manner in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 2012;61:104–13.

[58] Gorin Y, Block K. Nox as a target for diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 2013;125:361–82. doi:10.1042/CS20130065.

[59] Craige SM, Chen K, Pei Y, LI C, Huang X, Chen C, Shibata R, Sato K, Walsh K, Keaney JFJR. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation* 2011; 124:731–40.

- [60] Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, Calkin AC, Biessen EA, Touyz RM, Cooper ME, Schmidt HH, Jandeleit-Dahm KA. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36(2):295-307.
- [61] Schöder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissman N, Dimmeler S, Shah AM, Brandes RP. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 2012; 110(9):1217-25.
- [62] Dong K, Ni H, Wu M, Tang Z, Halim M, Shi D. ROS-mediated glucose metabolic reprogram induces insulin resistance in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;476:204–11.
- [63] Chattopadhyay M, Khemka VK, Chatterjee G, Ganguly A, Mukhopadhyay S, Chakrabarti S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol Cell Biochem* 2015;399:95–103.
- [64] Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 1997;328 (Pt 2:599–605.
- [65] BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*, v. 23, n.4, p.629-643, 2010.
- [66] Sharpe PC, Liu W-H, Yue KK, McMaster D, Catherwood MA, McGinty AM, Trimble ER (1998) Glucose induced oxidative stress in vascular contractile cells. *Diabetes* 47: 801–809
- [67] Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 1982; 257(10):5751-4.
- [68] Raza H, John A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:72–8.
- [69] Kaleem M, Asif M, Ahmed QU, Bano B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J* 2006;47:670–5.
- [70] Yu H, Zhen J, Pang B, Gu J, Wu S. Ginsenoside Rg1 ameliorates oxidative stress and myocardial apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015;16:344–54.
- [71] Akhtar MS, Pillai KK, Hassan Q, Ansari SH, Ali J, Akhtar M, Najmi K. Levosimendan suppresses oxidative injury, apoptotic signaling and mitochondrial degeneration in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Clin Exp Hypertens* 2016;38:10–22.
- [72] Forsberg H, Borg LA, Cagliero E, Eriksson UJ. Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radic Res* 1996;24:451–9.
- [73] Sivan E, Lee YC, Wu YK, Reece EA. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology* 1997;56:343–9.
- [74] Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* 1999;60:376–86.
- [75] Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W, Kinalska I. Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol* 2000;37:179–83.

- [76] Le Blanc S, Villarroel P, Candia V, Gavilan N, Soto N, Perez-Bravo F, et al. Type 2 diabetic patients and their offspring show altered parameters of iron status, oxidative stress and genes related to mitochondrial activity. *Biometals* 2012;25:725–35.
- [77] Stone V, August PM, Stocher DP, Klein CP, Couto PRG, Silva YD, et al. Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. *Free Radic Res* 2016;50:530–41.
- [78] Bouanane S, Benkalfat NB, Baba Ahmed F-Z, Merzouk H, Mokhtari NS, Merzouk S-A, et al. Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:669–80.
- [79] Zhang X, Strakovsky R, Zhou D, Zhang Y, Pan Y-X. A maternal high-fat diet represses the expression of antioxidant defense genes and induces the cellular senescence pathway in the liver of male offspring rats. *J Nutr* 2011;141:1254–9.
- [80] Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1609–18.
- [81] Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C53-60.
- [82] OLIVEIRA DRF. Diabetes gestacional induzida por estreptozotocina: implicações cardíacas na prole adulta. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enfermagem) – Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, 2014.
- [83] DA SILVA OA. Tese de Doutorado – Impacto da hiperglicemia gestacional sobre o padrão morfofuncional cardíaco na prole adulta. UFPE, Recife, 2015.
- [84] Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*, 2012;135(1):54-70.
- [85] González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, López-Olañeta MM, Sandoval P, Snabel J, López-Cabrera M, Erler JT, Hanemaaijer R, Lara-Pezzi E, Rodríguez-Pascual F. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 2016;109(1):67-78.
- [86] Wang Z, Li L, Du R, Yan J, Liu N, Yuan W, et al. CML/RAGE signal induces calcification cascade in diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2016;8:83.
- [87] Frisbee JC. Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R307–16.
- [88] Kobayashi N, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2114–21.

TABLES AND FIGURES

Table 1: Body weight (g) and serum levels of biochemical parameters (mg/dL) in the offspring of control mothers (OCR) and offspring rats from diabetic mothers (ODR) 3, 6, 12 and 18 months of age

Parameters								
	OCR				ODR			
	3	6	12	18 Months	3	6	12	18 Months
Body weight	340.0±5.3	410.0±5.3	500.0±9.0	590.0±5.9	270.0±9.2***	340.0±6.0***	420.0±8.0***	500.0±2.2***
Glucose	76.0±3.7	79.0±2.1	83.0±2.7	80.0±2.9	85.0±3.6	82.0±3.2	84.0±2.4	120.0±2.2***
Triglycerides	33.0±3.3	37.0±4.8	49.0±3.2	51.0±2.3	56.0±2.2***	52.0±2.9*	83.0±6.8 ***	78.0±3.5***
Total cholesterol	51.0±2.4	68.0±1.2	72.0±2.7	63.0±2.1	52.0±2.0	64.0±3.3	76.0±3.7	62.0±2.1
HDL cholesterol	33.0±1.8	28.0±1.2	25.0±1.0	29.0±2.1	31.0±1.0	31.0±1.3	25.0±1.7	35.0±4.0

Values are means ± SEM for seven animals for each experimental group. Comparisons were made using two-way ANOVA. Asterisks denote significant statistical differences (*p < 0.05; ***p < 0.001).

Table 2: Levels of liver and muscle glycogen (%) from offspring of control mothers (OCR) and offspring rats from diabetic mothers (ODR) 3, 6 and 12 months of age

Levels of Glycogen						
	OCR			ODR		
	3	6	12 Months	3	6	12 Months
Liver glycogen	5.7±0.05	6.1±0.26	3.1±0.35	5.8±0.43	3.8±0.37***	1.4±0.10**
Muscle glycogen	0.60±0.02	0.61±0.02	0.31±0.02	0.61±0.02	0.56±0.03	0.28±0.01

Values are means ± SEM for five animals for each experimental group. Comparisons were made using two-way ANOVA. Asterisks denote significant statistical differences (**p < 0.01; ***p < 0.001).

Table 3: Effect of gestational diabetes on oxidative stress markers in aortas from offspring 3, 6 and 12 months of age and in heart from offspring 12 and 18 months of age

Oxidative stress markers (nmol/ mg of protein)						
Groups	ROS	Nitrite	GSH	GSSG	SOD	Catalase
Aorta						
OCR-3m	110.0±3.40	3.6±0.27	7.9±2.40	4.4±0.23	5.7±0.32	1.3±0.15
ODR-3m	110.0±3.50	3.1±0.14	7.8±3.30	4.5±0.32	6.4±0.36	1.2±0.13
OCR-6m	220.0±14.0	4.5±0.17	9.6±4.2	5.7±0.22	11.0±0.23	2.0±0.23
ODR-6m	190.0±88.0	4.1±0.27	8.8±3.8	5.5±0.34	10.0±0.28	2.1±0.11
OCR-12m	110.0±3.5	10.0±0.86	10.0±4.8	8.8±0.62	11.0±0.10	1.5±0.22
ODR-12m	110.0±3.6	11.0±0.37	10.0±2.6	7.6±0.78	10.0±0.30	1.7±0.15
Heart						
OCR-12m	290.0±19.0	13.0±0.13	11.0±0.69	12.0±0.87	11.0±0.036	1.3±0.80
ODR-12m	380.0±23.0*	5.2±0.13**	7.8±0.47**	9.6.0±0.64*	7.8±0.06****	0.99±0.03**
OCR-18m	240.0±31.0	13.0±0.19	15.0±0.77	15.0±0.46	15.0±0.17	1.2±0.10
ODR-18m	380.0±21.0****	6.1±0.05*	12.0±0.64*	13.0±0.86*	7.4±0.07**	0.82±0.09*

Values are means ± SEM for seven animals for each experimental group. Comparisons were made using unpaired Student's t-test. Asterisks denote significant statistical differences (*p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.001). ROS, reactive oxygen species; GSH, glutathione; GSSG, oxidized glutathione; SOD, superoxide dismutase.

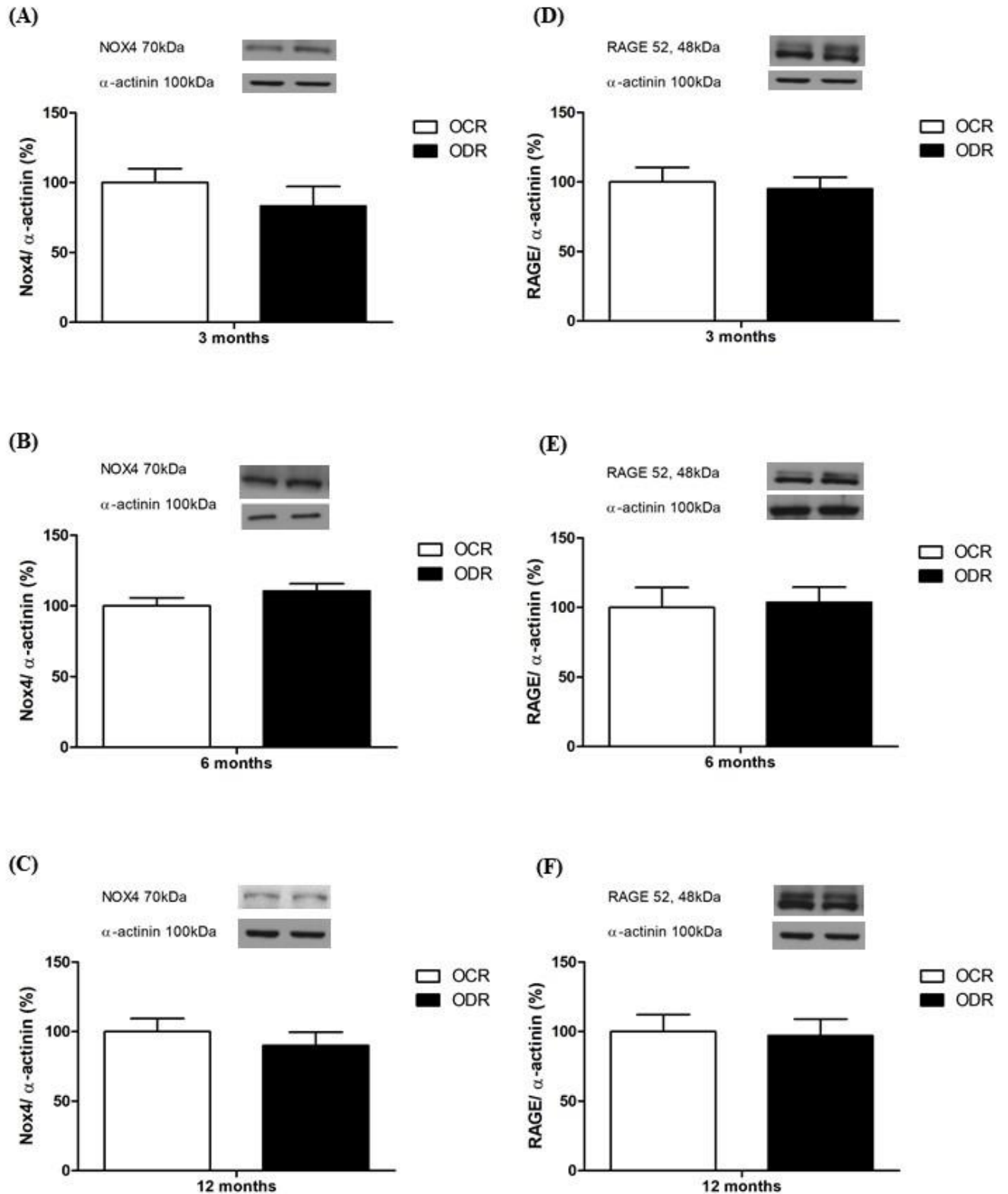


Figure 1: Expression of RAGE and Nox4 protein in aortas of the offspring of control mothers (OCR, white bar) and diabetic mothers (ODR, black bar) at age 3 (A and D), 6 (B and E) and 12 (C and F) months. Values are means $\pm$ SEM for five animals for each experimental group. Three independent experiment yielded similar results. Nox4 protein expression was normalized to α -actinin. Comparisons were made using unpaired Student's t-test. Asterisks denote significant statistical differences ($p > 0.05$).

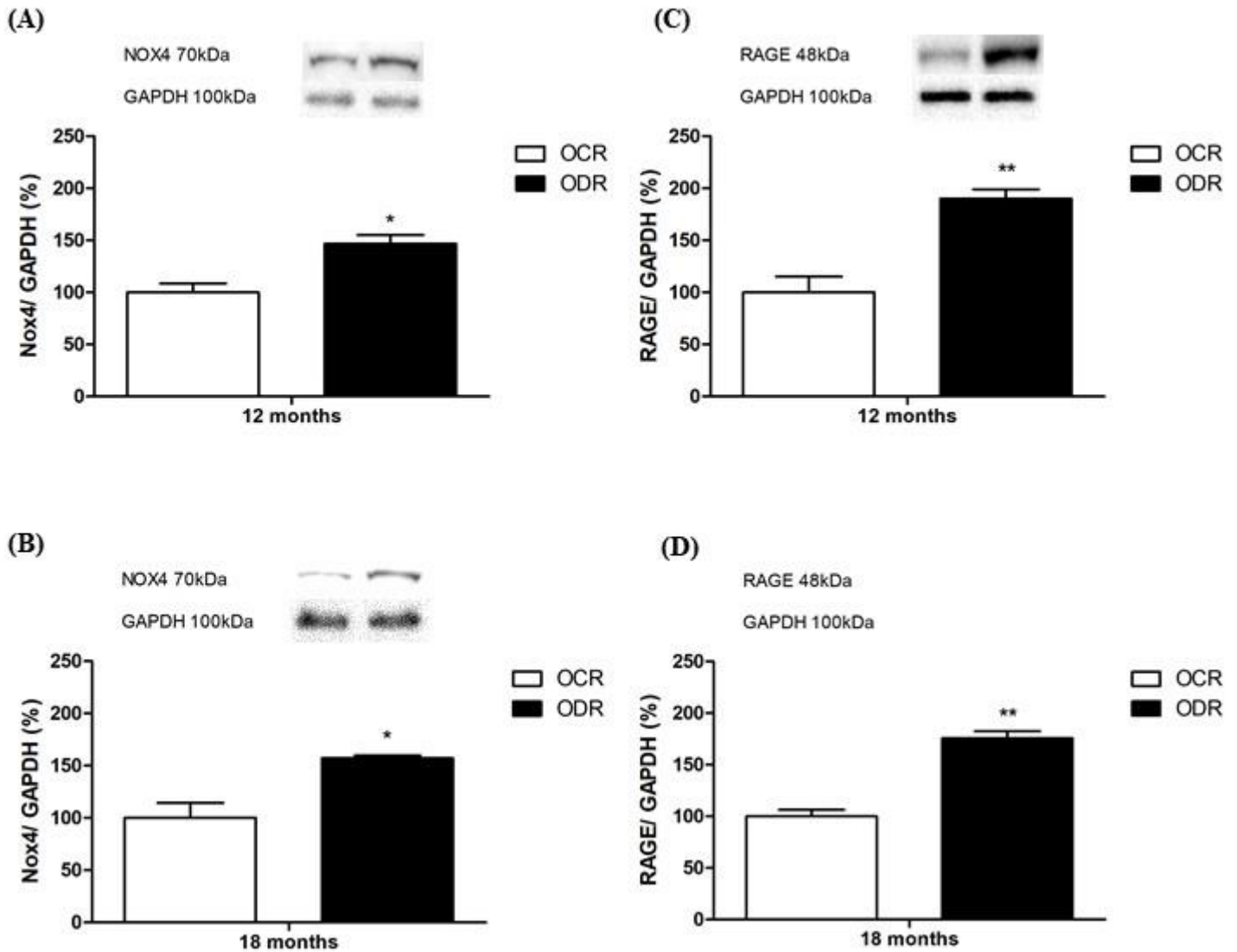


Figure 2: Expression of RAGE and Nox4 protein in heart of the offspring of control mothers (OCR, white bar) and diabetic mothers (ODR, black bar) at age 12 (A and C) and 18 (B and D) months. Values are means $\pm$ SEM for five animals for each experimental group. Two independent experiment yielded similar results. Nox4 protein expression was normalized to GAPDH. Comparisons were made using unpaired Student's t-test. Asterisks denote significant statistical differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

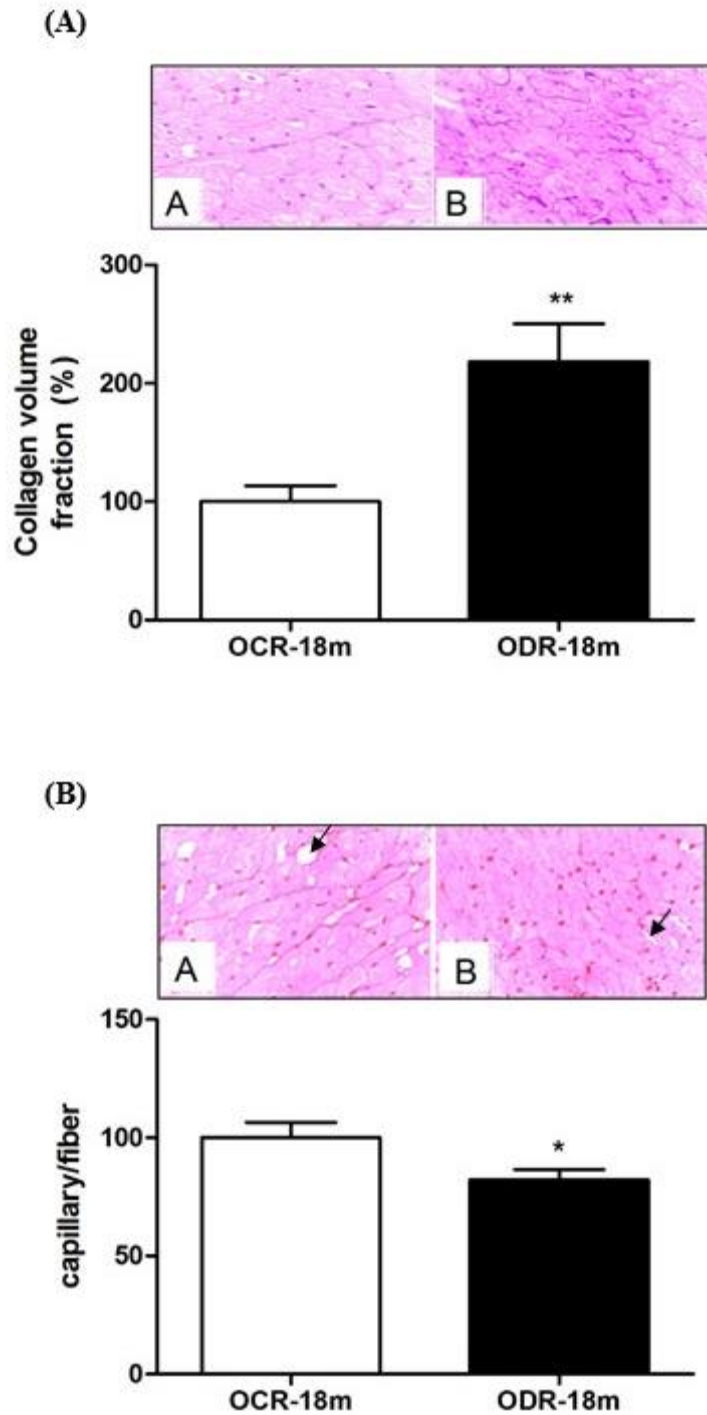


Figure 3. Collagen volume fraction (A) and identification of capillary rarefaction to fiber (B) in heart muscle in the offspring of control mothers (OCR, white bar and image A) and diabetic mothers (ODR, black bar and image B) at age 18 months. Values are means $\pm$ SEM for five animals for each experimental group. Comparisons were made using unpaired Student's t-test. Asterisks denote significant statistical differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

**ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA
UFPE**



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de julho de 2014.

Ofício nº 28/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Gloria Isolina Boente Pinto Duarte**

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.011857/2014-81

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Diabetes gestacional induzido por estreptozotocina: contribuição do estresse oxidativo e enzimas NADPH oxidase no desenvolvimento de lesões vasculares na prole."**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE; Animais: rato heterogênico; Linhagem; Wistar; Sexo: machos com 3, 6 e 12 meses de idade e 200-500g de peso; Fêmeas com 3 meses de idade e com peso de 200-250g; Número de animais previsto no protocolo: 64.

Atenciosamente,

Prof.^a Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635