



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

HICLA STEFANY NUNES MOREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO DOS EFEITOS DO DIABETES MELLITUS MATERNO SOBRE AS
PROPRIEDADES MIOGÊNICAS, MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS
DE RATOS**

RECIFE

2020

HICLA STEFANY NUNES MOREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO DOS EFEITOS DO DIABETES MELLITUS MATERNO SOBRE AS
PROPRIEDADES MIOGÊNICAS, MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS
DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Fabiano Elias Xavier

RECIFE

2020

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

Queiroz, Hicla Stefany Nunes Moreira de

Estudos dos efeitos do diabetes mellitus materno sobre as propriedades miogênicas, mecânicas e estruturas de artérias de ratos / Hicla Stefany Nunes Moreira de Queiroz. - 2020.

133 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Diabetes. 2. Diabetes na gravidez. 3. Diabetes – Complicações e sequelas. I. Xavier, Fabiano Elias (orientador). II. Título.

618.3646

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-124

HICLA STEFANY NUNES MOREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO DOS EFEITOS DO DIABETES MELLITUS MATERNO SOBRE AS
PROPRIEDADES MIOGÊNICAS, MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS
DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovado por:

Fabiano Elias Xavier - UFPE

Glória Isolina Boente Pinto Duarte - UFPE

Leucio Duarte Vieira Filho - UFPE

Valéria Nunes de Souza - UFPE

Luiza Antas Rabelo - UFAL

Data: 31/01/2020

*Dedico a Deus, ao meu esposo e filha,
aos meus pais e irmão, família e
amigos. Pelo total apoio.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Fabiano Elias Xavier, pelo respeito, paciência, incentivo desde os primeiros passos na pesquisa científica, por sua orientação e conhecimentos a mim fornecidos que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

À profa. Glória Isolina B. P. Duarte, à profa. Cristina de Oliveira Silva e à profa. Valéria Nunes de Souza, pela disponibilidade e apoio demonstrados.

A todos os meus amigos de laboratório, pela dedicação, auxílio nos experimentos, pelas manhãs e tardes compartilhando sonhos, necessidades, frustrações e egrias. Muito obrigada.

Aos professores Belmira, Paulo Euzébio e Adriana Fontes pela ajuda e dedicação na realização de experimentos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório José Antônio, Filipe, Thays, Marcelo e a veterinária Claudia, pelo cuidado com os animais em estudo, por atender às necessidades surgidas durante meu doutorado. À técnica da UFRPE Edna pela ajuda na realização de alguns experimentos. Aos secretários da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Djalma e Fernanda, pela dedicação, paciência e disponibilidade.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Edital Multiusuário), pelo apoio financeiro.

A todos que de forma direta ou indiretamente me apoiaram e me ajudaram na realização desta tese.

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me
apoiei em ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

RESUMO

A exposição intrauterina à hiperglicemia materna promove disfunção endotelial, vasoconstrição e hipertensão na prole adulta. Além das alterações funcionais, a hipertensão frequentemente evolui com alterações estruturais e mecânicas nos vasos de resistência. Diante disso, o presente estudo investigou se a exposição intrauterina à hiperglicemia materna durante a gravidez e a lactação altera as propriedades miogênicas, mecânicas e/ou estruturais das artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos. O diabetes experimental foi induzido por injeção intravenosa de estreptozotocina em ratas Wistar com uma semana de gestação e a prole foi dividida em quatro grupos: ratos machos provenientes de mães controle (O-CR) e diabéticas (O-DR) com 3 e 12 meses. Nestes animais foram avaliados o peso corporal desde o nascimento até o dia do experimento, a glicemia e a pressão arterial. Para a investigação das possíveis alterações das propriedades miogênicas, mecânicas e estruturais nas AMR destes animais, utilizou-se a técnica de artérias pressurizadas através de um miógrafo de pressão. Analisou-se o conteúdo e a organização da elastina e colágeno, além de sua expressão. Em comparação ao grupo O-CR, os animais do grupo O-DR apresentaram baixo peso ao nascimento e durante todo o período de acompanhamento. Apenas o grupo O-DR com 12 meses apresentou pressão arterial elevada quando comparado ao seu respectivo controle. As AMR de ratos O-DR com 3 e 12 meses apresentaram uma maior contração miogênica em comparação aos seus respectivos controles. Os parâmetros estruturais e mecânicos das AMR do grupo O-DR 3 meses foram semelhantes aos do grupo O-CR. Entretanto, as artérias do grupo O-DR 12 meses apresentaram redução do diâmetro interno, acompanhada de aumento da espessura da parede, da relação parede/lúmen e da área de secção transversal, indicando um remodelamento hipertrófico para dentro. A relação *stress-strain* do grupo O-DR 12 meses se apresentou desviada para a direita em comparação ao grupo O-CR, significando uma menor rigidez arterial. Nestas artérias, tanto a complacência como a distensibilidade estavam aumentadas no grupo O-DR 12 meses. Estas alterações mecânicas nas AMR do grupo O-DR 12 meses podem ser justificadas pela menor expressão de colágeno tipo 1 e pela redução do conteúdo da elastina encontrados nessas artérias. Esses índices possivelmente estão associados com o aumento da

expressão da metaloproteinase da matriz (MMP)-9, que aumentaria a degradação do colágeno nas artérias do grupo O-DR 12 meses, mesmo a expressão dos inibidores de metaloproteinases da matriz (TIMP)-1, TIMP-2 estando inalterada. A expressão do fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1) também foi aumentada nas AMR do grupo O-DR 12 meses, o qual pode levar à hipertrofia da camada média. Em resumo, os resultados demonstram que a exposição intrauterina ao diabetes mellitus induz alterações estruturais, mecânicas e miogênicas nas AMR de ratos adultos, as quais parecem contribuir para o aumento da resistência vascular periférica, e conseqüentemente da pressão arterial nestes animais.

Palavras-chave: Programação fetal. Diabetes mellitus. Remodelamento vascular. Matriz extracelular. Proteínas regulatórias da matriz.

ABSTRACT

Intrauterine exposure to maternal hyperglycemia promotes endothelial dysfunction, vasoconstriction and hypertension in adult offspring. In addition to functional changes, hypertension frequently courses with structural and mechanical changes in resistance vessels. In view of this, the present study investigated whether intrauterine exposure to maternal hyperglycemia during pregnancy and lactation alter the myogenic, mechanical and/or structural properties of rat mesenteric resistance arteries (MRA). Experimental diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin in pregnant Wistar rats and the offspring were divided into four groups: 3- and 12-month-old offspring from controls mothers (O-CR 3M and 12M) and 3- and 12-month-old offspring from diabetic mothers (O-DR 3M and 12M). In these animals, body weight, blood glucose and blood pressure were evaluated. Myogenic, mechanical and structural properties of the MRA were assessed by using pressure myography technique. The content and organization of elastin and collagen were also analyzed. O-DR group had low birth weight and throughout the follow-up period (12 months) compared with O-CR group. O-DR 12M had higher arterial pressure than O-CR 12M, while O-DR 3M were normotensive. MRA from 3- and 12-month-old O-DR rats showed a greater myogenic contraction compared to their respective controls. The structural and mechanical parameters of the O-DR 3M MRA were similar to those of the O-CR 3M group. However, lumen diameter was decreased and wall thickness, wall/lumen ratio and cross-sectional area were increased in MRA of O-DR 12M, indicating inward hypertrophic remodeling. In addition, O-DR 12M MRA showed decreased stiffness, as shown by the rightward shift of the stress-strain relationship. In these arteries, both compliance and distensibility were increased in MRA from O-DR 12M group. Mechanical changes in O-DR 12M MRA can be explained by the decreased type 1 collagen expression and by the reduction of the elastin content, which possibly are associated with increased expression of matrix metalloproteinase (MMP)-9, even the expression of matrix metalloproteinase inhibitors (TIMP)-1, TIMP-2 being unchanged. In O-DR 12M MRA, the expression of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was also increased, which can lead to middle layer hypertrophy. In summary, the results obtained here demonstrate that intrauterine exposure to diabetes mellitus induces structural, mechanical and

myogenic alterations in offspring MRA, which can be involved in the increased vascular resistance and blood pressure in these rats.

Keywords: Fetal programming. Diabetes mellitus. Vascular remodeling. Extracellular matrix. Regulatory proteins matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo de uma artéria de resistência mostrando os vários constituintes que formam a parede arterial (Modificado de Blausen.com staff, 2014).....	34
Figura 2 – A figura representa as diversas maneiras em que o remodelamento vascular pode modificar as seções transversais dos vasos sanguíneos. Adaptado de MULVANY, 1999.....	40
Figura 3 – Fatores humorais, genéticos e hemodinâmicos afetam as diversas proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina, fibronectina, entre outras) por modificações na síntese e na montagem ou degradação pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) ou pelo sistema plasminogênio (Adaptado de BRIONES; ARRIBAS; SALAICES, 2010).....	44
Figura 4 – Foto representativa de uma artéria mesentérica de resistência (terceiro ramo da artéria mesentérica superior - AMR) pressurizada a 70 mm Hg.....	54
Figura 5 – Reconstrução tridimensional das seções ópticas obtidas através de microscopia confocal da lâmina elástica interna (LEI) da parede vascular de artérias mesentéricas de resistência pressurizadas a 70 mm Hg.....	58
Figura 6 – Relação pressão:diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade em condições ativas e passivas.....	65
Figura 7 – Contração miogênica induzida pela elevação da pressão intraluminal em AMR de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade.....	66
Figura 8 – Comparação da relação pressão:diâmetro de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade.....	67
Figura 9 – Comparação dos parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade.....	68

Figura 10 – Relação pressão:diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade em condições ativas e passivas (Cálcio zero, $0Ca^{2+}$).....	70
Figura 11 – (A) Contração miogênica induzida pela elevação da pressão intraluminal em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade e (B) em ratos O-DR com 3 e 12 meses de idade.....	71
Figura 12 – Comparação da relação pressão:diâmetro de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	72
Figura 13 – Comparação dos parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	73
Figura 14 – Medidas de stress da parede, relação stress-strain e módulo elástico induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade.....	75
Figura 15 – Medidas de distensibilidade e complacência induzidas por mudanças crescentes de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade.....	76
Figura 16 – Medidas de stress da parede, relação stress-strain e módulo elástico induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	77
Figura 17 – Medidas de distensibilidade e complacência induzidas por mudanças crescentes de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, $0Ca^{2+}$) de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	78
Figura 18 – Reconstrução tridimensional das secções ópticas obtidas através de microscopia confocal da lâmina elástica interna (LEI) da parede vascular de artérias mesentéricas de resistência de rato pressurizadas a 70 mm Hg A imagem mostra a	

elastina representada em verde e suas diversas fenestrações (setas).....	80
Figura 19 – Comparação dos números de fenestras, áreas de fenestras e intensidade de fluorescência da elastina entre os grupos O-CR e O-DR com 12 meses.....	81
Figura 20 – Imagens representativas do conteúdo total de colágeno corado com Picrosirius Red em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos O-CR com 3 meses, O-CR com 12 meses, O-DR com 3 meses e O-DR com 12 meses de idade.....	83
Figura 21 – Gráfico com valores médios da área ocupada pelo colágeno em função da área total da parede vascular de artérias mesentéricas de ratos O-CR com 3 meses, O-CR com 12 meses, O-DR com 3 meses e O-DR com 12 meses de idade.....	84
Figura 22 – Imunomarcação do colágeno tipo 1 nas artérias mesentéricas de resistência (AMR) da prole O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	85
Figura 23 – Gráfico com valores médios da expressão do colágeno tipo 1 na parede vascular de artérias mesentéricas de ratos O-CR e O-DR com 12 meses.....	86
Figura 24 – Expressão das Metaloproteinases-2 (MMP-2) e MMP-9 em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	88
Figura 25 – Expressão dos Inibidores das Metaloproteinases-1 (TIMP-1), TIMP-2 e TGF- β 1 em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade.....	89

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Peso corporal, glicose sanguínea em jejum e pressão arterial média de ratos O-CR e O-DR com 3 e 12 meses (M) de idade.....	63
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMR	Artéria mesentérica de resistência
ANG II	Angiotensina II
ADA	Associação Americana de Diabetes
Ca ²⁺	Cálcio
COX-2	Ciclooxigenase-2
D _e	Diâmetro externo
D _i	Diâmetro interno
DM tipo 1	Diabetes mellitus tipo 1
DM tipo 2	Diabetes mellitus tipo 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
LEE	Lâmina elástica externa
LEI	Lâmina elástica interna
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases da matriz
MNU	N-metil-N-nitrosureia
MT-MMP	Metaloproteinases da matriz ligada à membrana
NO	Óxido nítrico
O-CR	Prole proveniente de ratas controle
O-DR	Prole proveniente de ratas diabéticas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
PFA	Paraformaldeído
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}

PARP	Poli(ADP-ribose)polimerase
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
STZ	Estreptozotocina
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TIMP	Inibidor de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TxA ₂	Tromboxano A ₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS.....	23
1.1.1 Objetivo Geral.....	23
1.1.2 Objetivos Específicos.....	23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE INTRAUTERINO NO DESENVOLVIMENTO DAS DOENÇAS DO ADULTO	24
2.2 MODELO DE DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ).....	26
2.3 FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES NA PROLE EXPOSTA À HIPERGLICEMIA MATERNA.....	29
2.4 ESTRUTURA DOS VASOS DE RESISTÊNCIA: CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS.....	31
2.4.1Túnica íntima.....	31
2.4.2 Túnica média.....	32
2.4.3 Túnica adventícia.....	33
2.4.4 Matriz extracelular.....	33
2.4.4.1 Colágeno	34
2.4.4.2 Elastina.....	35
2.4.4.3 Outros componentes da matriz extracelular.....	36
2.5 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, MECÂNICAS E MIOGÊNICAS DA PAREDE VASCULAR ASSOCIADAS À HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	37
2.6 MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO REMODELAMENTO VASCULAR.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	52
3.2 GLICEMIA E PESO CORPORAL.....	52

3.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	52
3.4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA O ESTUDO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO.....	53
3.4.1 Miógrafo de pressão.....	53
3.4.1.1 Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de resistência.....	54
3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	57
3.5.1 Estudo do conteúdo e organização da elastina.....	57
3.6 DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO NA PAREDE ARTERIAL.....	58
3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA DO COLÁGENO TIPO 1.....	59
3.8 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE COMPONENTES DA PAREDE VASCULAR.....	60
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
4 RESULTADOS.....	62
4.1 GLICEMIA E PESO CORPORAL DA PROLE.....	62
4.2 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA.....	62
4.3 PROPRIEDADES MIOGÊNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO.....	64
4.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO AVALIADO COM MIÓGRAFO.....	74
4.5 CONTEÚDO E ORGANIZAÇÃO DA ELASTINA.....	79
4.6 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE COLÁGENO.....	82
4.7 EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO 1 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	85
4.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DA MATRIZ EXTRACELULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO.....	87

4.8.1 Metaloproteinases da matriz (MMP)-2, MMP-9, inibidores de metaloproteinases tecidual (TIMP)-1, TIMP-2 e fator de crescimento transformador- β (TGF- β).....	87
5 DISCUSSÃO.....	90
6 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a prevalência global de diabetes em mulheres grávidas vem crescendo consideravelmente (FARRAR et al., 2016). Consequentemente, a relação entre a exposição intrauterina à hiperglicemia materna e o desenvolvimento de doenças crônicas na prole, especialmente as doenças cardiovasculares, tem sido objeto de estudos clínicos e experimentais.

O conceito de “programação fetal” é definido como o processo pelo qual um estímulo adverso durante o período crítico de desenvolvimento *in utero* induz doenças na vida adulta (BARKER, 1994, 1998). Trabalhos publicados pelo grupo do Dr. David Barker foram os primeiros a demonstrar o envolvimento de distúrbios ocorridos durante a fase intrauterina no desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (OSMOND, 1986; BARKER, 1989, 1994, 1998; BARKER). Na década de 80, este pesquisador e seus colaboradores demonstraram uma associação entre o baixo peso ao nascimento e a incidência de doenças cardiovasculares no Reino Unido. Analisando cerca de 10.000 homens nascidos entre 1911 e 1930 na cidade de Hertfordshire, Inglaterra, o grupo do Dr. Barker verificou que a incidência de óbitos em decorrência de cardiopatia isquêmica era maior entre os indivíduos que nasceram com peso corporal ao nascimento ou que apresentaram baixo peso corporal no primeiro ano de vida, comparado aos indivíduos com peso normal ao nascimento (OSMOND et al., 1993). Esta correlação entre o baixo peso ao nascer e a incidência de doença cardiovascular no indivíduo adulto foi verificada independentemente dos hábitos de vida (BARKER et al., 1989a, 1989b). Ademais, a análise posterior deste mesmo grupo de indivíduos mostrou que os que nasceram com baixo peso corporal apresentaram maior susceptibilidade ao Diabetes tipo 2 (DM tipo 2) e à síndrome metabólica quando adultos (HALES et al., 1991; BARKER et al., 1993).

Estudos em ratos expostos à hiperglicemia materna severa durante a gravidez e lactação demonstram que a prole tem restrição do crescimento durante o desenvolvimento fetal e apresentam baixo peso ao nascimento (SONG et al., 2012). Na idade adulta desenvolvem intolerância à glicose, estresse oxidativo (DONG et al., 2013), dislipidemia (HOLEMANS et al., 2000), resistência à insulina, obesidade (LAWLOR et al., 2011), hipertensão (NERENBERG et al., 2014) e desordens vasculares (HOLEMANS et al., 2000; ROCHA et al., 2005; VAN HUYEN et al., 2010;

RAMOS-ALVES et al., 2012a). A disfunção vascular presente nestes animais é decorrente da redução de fatores vasodilatadores dependente do endotélio, como o óxido nítrico (NO), e da elevada liberação de substâncias vasoconstritoras, como os prostanoídes derivados da ciclooxigenase-2 (COX-2) (TXA₂, PGE₂ e PGF_{2α}) (RAMOS-ALVES et al., 2012a,b; TUFIÑO et al., 2014), a angiotensina II e os ânions superóxidos (LAPPAS et al., 2011; KATKHUDA, et al., 2012). Estes prejuízos são relatados em artérias aorta, renais e mesentéricas (HOLEMANS et al. 2000; ROCHA et al. 2005; PORTO et al. 2010; RAMOS-ALVES et al. 2012a,b), os quais foram associados ao desenvolvimento e/ ou manutenção da hipertensão arterial neste modelo.

Está bem documentado na literatura que a hipertensão crônica, além das alterações funcionais, cursa com alterações estruturais e mecânicas dos vasos arteriais (SCHIFFRIN, 1992; MULVANY, 2002; MULVANY, 2003), as quais têm sido denominadas de remodelamento vascular. Este processo refere-se à capacidade da parede vascular reorganizar seus componentes celulares e extracelulares em resposta a um estímulo crônico, como por exemplo, ao aumento de fluxo sanguíneo ou ao aumento da pressão transmural (GIBBONS; DZAU, 1994). De acordo com Mulvany (1999), o remodelamento vascular pode ser classificado como hipertrófico (quando há um aumento da área de secção transversal da parede arterial), hipotrófico (quando ocorre redução da área de secção transversal) ou eutrófico (quando há somente um rearranjo dos constituintes da parede vascular, sem alteração da área de secção transversal). Esse remodelamento pode ainda ser classificado como “para dentro”, quando ocorre redução do diâmetro interno do vaso, ou “para fora”, quando o diâmetro interno aumenta. Na maioria dos modelos experimentais de hipertensão, assim como em pacientes hipertensos, o diâmetro interno de pequenas artérias de resistência está reduzido e a relação parede: lúmen está aumentada, com diminuição da complacência e aumento da rigidez vascular, podendo influenciar a resistência ao fluxo sanguíneo (SCHIFFRIN, 1992; BAUMBACH, 1994; INTENGAN et al., 1999; MULVANY, 2002; BRIONES et al., 2003; TOUYZ, 2004). Estas alterações nos pequenos vasos arteriais tornam-se ainda mais pronunciadas em pacientes acometidos de hipertensão e diabetes mellitus, sugerindo que o agrupamento de fatores de risco pode ter efeitos deletérios sinérgicos sobre a vasculatura (RIZZONI et al., 2001).

Portanto, é plausível hipotetizar que a exposição à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina e a lactação possa induzir alterações mecânicas e/ ou estruturais da parede arterial na prole adulta, já que esta apresenta pressão arterial elevada e expressão de mecanismos inflamatórios na parede arterial, o qual é sabido contribuir para o remodelamento arterial em várias situações de risco cardiovascular. No presente estudo, foram desenvolvidas abordagens experimentais para a elucidação destas possíveis alterações e seus mecanismos em pequenas artérias de resistências da circulação mesentérica de ratos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar se a exposição à hiperglicemia materna durante a gravidez e lactação cursa com alterações das propriedades miogênicas, mecânicas e estruturais de artérias mesentéricas de resistência oriundas de ratos, bem como investigar os mecanismos implicados nestas alterações.

1.1.2 Específicos

- Investigar possíveis alterações nas propriedades mecânicas de artérias mesentéricas de resistência de ratos expostos à hiperglicemia materna em ratos com 3 e 12 meses de idade;
- Avaliar, nestes animais, possíveis alterações nas propriedades estruturais de artérias mesentéricas de resistência;
- Averiguar possíveis alterações nas fenestras na lâmina elástica interna destes animais;
- Avaliar o envolvimento de proteínas da matriz extracelular no remodelamento vascular através da determinação de colágeno na parede arterial;
- Analisar a expressão de proteínas regulatórias da matriz extracelular (metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases e TGF- β 1) na parede arterial.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE INTRAUTERINO NO DESENVOLVIMENTO DAS DOENÇAS DO ADULTO

No início da década de 60 surgiram as primeiras evidências de que fatores adversos que acometem gestantes durante o período crítico de desenvolvimento embrionário, fetal e neonatal estão associados às condições de saúde dos indivíduos adultos. Estímulos anormais sobre o ambiente intrauterino tem a capacidade de perturbar o crescimento fetal, alterando permanentemente a estrutura, a fisiologia e o metabolismo de tecidos e órgãos do feto, predispondo-o ao desenvolvimento de doenças crônicas após o nascimento, como as doenças metabólicas e cardiovasculares (ASHTON, 2000; BARKER; BAGBY, 2005; PINNEY; SIMMONS, 2012).

Na década de 1980, trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa do Dr. David Barker propuseram que as doenças cardiovasculares e as desordens metabólicas em uma população da Inglaterra e do País de Gales poderiam ter origem ainda durante o desenvolvimento fetal (BARKER; OSMOND, 1986). Utilizando o marcador bruto de baixo crescimento fetal, Barker notou uma relação inversa entre o peso ao nascimento e o desenvolvimento de várias doenças na vida adulta, tais como hipertensão arterial, doenças coronarianas, alterações no metabolismo do colesterol, aumento da resistência à insulina, além de desordens na função endócrina (BARKER et al., 1993; BARKER; OSMOND, 1988; BUNT; TATARANNI; SALBE, 2005; EL-OSTA et al., 2008; HALES; BARKER, 1992; MANDERSON et al., 2002;). Estas observações levaram à “*Hipótese de Barker*” ou “*Teoria da origem fetal das doenças do adulto*” segundo a qual a nutrição deficiente durante a vida intrauterina e infância precoce origina uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente que aumenta o risco de desenvolvimento de doença coronariana e outras doenças associadas, como a hipertensão arterial, o diabetes e o acidente vascular cerebral, na vida adulta – Programação Fetal (BARKER, 1998). Segundo alguns estudos, quando há menor demanda nutricional fetal, o feto passa por um processo de adaptação à sobrevivência durante a gestação, resultando em uma redistribuição do fluxo sanguíneo. Esta redistribuição pouparia órgãos mais importantes (como o cérebro) às custas de outros órgãos, que teriam sua

morfologia, fisiologia e metabolismo afetados, de maneira a “programá-los” para um risco aumentado de desenvolvimento de doenças crônicas após o nascimento, como por exemplo a hipertensão arterial (BARKER; OSMOND, 1986).

Dados publicados em 2012 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a desnutrição materna continua sendo um problema de saúde pública mundial, a qual tem relação direta com o baixo peso ao nascimento. Anualmente, cerca de 20 milhões de crianças em todo o mundo nascem com peso reduzido (pesando menos que 2,5 Kg), o que representa cerca de 15,5% dos nascimentos (BLACK et al., 2008). No Brasil, dados recentes mostram que o baixo peso ao nascer acomete aproximadamente 8% dos nascidos vivos (DE SOUZA BURIOL et al., 2016), sendo que os maiores índices foram encontrados em regiões de maior desenvolvimento socioeconômico como o sul e o sudeste (SILVA et al., 2010; LIMA et al., 2013).

A maioria dos estudos epidemiológicos e experimentais vinha dando maior destaque ao efeito da desnutrição materna sobre a ‘programação fetal’ de algumas doenças na vida adulta. Porém, nas últimas duas décadas, outros insultos tem sido estudados com o intuito de compreender a maneira pela qual o ambiente intrauterino pode influenciar tanto o desenvolvimento fetal, quanto a predisposição a diversas doenças. Existem hoje inúmeros estudos demonstrando que a exposição fetal aos glicocorticoides (KHORRAM et al., 2014), ao excesso de sódio (CABRAL et al., 2012; SANTOS-ROCHA et al., 2019) ou à hiperglicemia (RAMOS-ALVES et al., 2012a; DE QUEIROZ et al., 2015; DE SÁ et al., 2017), têm uma contribuição importante para o desenvolvimento de complicações desde a vida intrauterina até a vida adulta.

Os mecanismos que iniciam as respostas que desencadeiam a programação fetal das doenças do adulto não são completamente conhecidos. Porém, nos últimos anos tem surgido informações na literatura de que as modificações epigenéticas desempenham um papel fundamental, tendo em vista que durante as várias fases de desenvolvimento, o epigenoma de um indivíduo está significativamente mais sensível aos fatores ambientais. Alguns estudos sugerem fortemente que estas alterações epigenéticas possuem um papel fundamental nas respostas adaptativas aos fatores nutricionais e ambientais durante a vida fetal e neonatal (AKYOL;

MCMULLEN; LANGLEY-EVANS, 2012; MASLOVA et al., 2017; MORTENSEN et al., 2014), podendo, desta forma, envolver genes impressos e não impressos.

A epigenética é um importante agente regulador destas interações e seu atual conceito diz respeito aos padrões estáveis e herdáveis de expressão gênica e que não envolvem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA (EGGER et al., 2004; FEINBERG; TYCKO, 2004). Os principais mecanismos de regulação epigenética envolvem a metilação do DNA, as modificações pós-transcricionais nas histonas e a atuação de RNAs não codificantes, dentre os quais se destaca a atuação dos microRNAs (UDALI et al., 2013). Estes marcadores epigenéticos têm o potencial de modular a expressão gênica, o que é um importante determinante em muitas doenças. Ruchat et al. (2013) sugeriram que estes marcadores representam um possível mecanismo pelo qual a exposição a um ambiente intrauterino adverso se traduza no desenvolvimento de doenças, como a obesidade e o DM tipo 2 entre a descendência. Porém, não está totalmente esclarecido se estas alterações são reversíveis ou irreversíveis (GALJAARD; DEVLIEGER; VAN ASSCHE, 2013). O que se sabe até então com estudos com animais é fenótipo apresentado em decorrência da programação fetal não é transmitido para seus descendentes por acasalamento, mas apenas pela influência ambiental uterina (BOUCHARD et al., 2010; DABELEA; CRUME, 2011). Isso ressalta a importância do ambiente embrionário na impressão epigenética de mecanismos fisiopatológicos nas futuras gerações.

2.2 MODELO DE DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

Até o presente, muitos modelos animais de diabetes foram desenvolvidos (RADENKOVIC et al., 2016) e estes tornaram-se indispensáveis para a pesquisa em diabetes e suas complicações (WU et al., 2015), bem como para o estudo de novos fármacos antidiabéticos (TRIPATHI; VERMA, 2014).

Em animais de laboratório, a indução experimental dessa doença pode ser realizada de forma química, genética e cirúrgica/imunológica (RADENKOVIC et al., 2016) com uso de técnicas que incluem: destruição química das células β pancreáticas, remoção cirúrgica da massa de células β , pancreatectomia, injúria do hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má nutrição

intrauterina ou altas doses de hormônios contra regulatórios como os glicocorticoides (TRIPATHI; VERMA, 2014; CAZAROLLI, 2004; SILVA; NOGUEIRA, 2015; SHARMA et al., 2016; AL-AWAR et al., 2016). Todavia, os métodos químicos são bastante simples, convenientes (SZKUDELSKI, 2001) e viáveis para este tipo de experimentação, por apresentarem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (LERCO et al., 2003).

A estreptozotocina (STZ) é utilizada para indução do DM (GUNDALA et al., 2016; ANTONY et al., 2017; CUNHA et al., 2017; DHANANJAYAN et al., 2017; EL-BASSOSSY et al., 2017; HOSSEINI et al., 2017; MAHMOUD, et al., 2017; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Esta foi inicialmente isolada e caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro a partir de colônias de *Streptomyces achromogenes* (HERR; EBLE; JAHNKE, 1960). A STZ é uma molécula alquilante análoga da nitrosourea e derivada da glicosamina, que consiste em uma hexose com uma porção N-metil-N-nitrosureia (MNU) ligado ao seu carbono 2, com seletividade e toxicidade para as células β pancreáticas (LENZEN, 2008; ELEAZU et al., 2013; SARGIS, 2014; ISLAM et al., 2017). Esta molécula é um composto hidrofílico devido à substituição da hexose que limita a sua absorção pelas células, sendo, portanto, captada pelas células β pancreáticas via transportadores GLUT-2 (LENZEN, 2008; ELEAZU et al., 2013). A STZ atua na metilação de proteínas e do DNA. Esse último mecanismo, ocorre por meio da transferência do radical metil da porção MNU dessa molécula ao DNA da célula β , especialmente na posição O⁶ da guanina. Na tentativa de reparo do DNA, a poli(ADP-ribose)polimerase (PARP) é bastante estimulada, reduzindo o Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) celular, e consequentemente os estoques de ATP. A depleção das reservas de energia celular resulta, portanto, em necrose das células β (LENZEN, 2008). O tempo de ação desta é cerca de 19 min (<http://www.sigmaaldrich.com>).

A STZ provoca hiperglicemia, hipoinsulinemia, perda de massa corporal, glicosúria, poliúria e polifagia que refletem a anormalidade no funcionamento das células β do pâncreas, distúrbios estes semelhantes aos observados em humanos com diabetes do tipo-1 descompensada (KEELY et al., 2008). A evidência histológica de lesão das células β é detectável entre uma e sete horas após a

administração da STZ, nas 24 horas seguintes o conteúdo de insulina dessas células é reduzido em 95%, estabelecendo o quadro de hiperglicemia (DAMASCENO et al., 2002). Também estão presentes no diabetes experimental diversas complicações crônicas micro e macrovasculares como a neuropatia, nefropatia e cardiopatia diabética (JUNOD et al., 1967; HAKIM et al., 1997; SCHAAN et al., 2001; DE ANGELIS et al., 2002). Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA) (2016), a hiperglicemia é classificada como moderada entre 126 e 300 mg·dL⁻¹ e acima de 300 mg·dL⁻¹ como severa (ADA, 2016). Aerts e Assche (1979) sugeriram que um ambiente levemente hiperglicêmico está associado a fetos macrossômicos e hipoinsulinêmicos, e que mães severamente diabéticas podem gerar fetos com baixo peso corporal e malformados (HOLEMANS et al., 1991).

Os ratos com diabetes induzido por STZ além de apresentarem diminuição na atividade física diária, na temperatura corporal (HOWARTH et al., 2006), reflexos cardiovasculares alterados e variabilidade da frequência cardíaca em corações isolados (OLIVEIRA et al., 1997; SCHAAN et al., 2004; DE ANGELIS et al., 2009), demonstraram 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). No intuito de reproduzir efeitos metabólicos maternos e fetais semelhantes ao diabetes pré-gestacional e ao diabetes materno, a STZ pode ser administrada tanto por via endovenosa (e.v.) quanto intraperitonealmente (i.p.) (DELFINO et al., 2002), com doses variadas e que pode ser realizada no período neonatal (KAYA-DAGISTANLI; OZTURK, 2013), antes do acasalamento (LÓPEZ-SOLDADO; HERRERA, 2003) ou durante a gravidez (RAMOS-ALVES et al., 2012a e 2012b).

É importante salientar que o desenvolvimento das células β 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 et al. (2011) demonstraram que o pâncreas da prole de ratos fêmeas submetidas a 35 mg·kg⁻¹ de STZ no dia 0 de gestação, encontrava-se histologicamente normal, sugerindo que o diabetes materno não altera a massa de células β . De acordo com a literatura, 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. Junod et al. (1969), comprovaram a atividade diabetogênica da STZ para ratos Wistar, demonstrando que o diabetes pode ser induzido nas doses de 25 a 100 mg·kg⁻¹ e que a gravidade do distúrbio metabólico é proporcional à dose utilizada. Portanto, a sensibilidade a STZ depende da espécie animal, sexo, idade e estado nutricional.

2.3 FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES NA PROLE EXPOSTA À HIPERGLICEMIA MATERNA

A exposição à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina tem uma contribuição importante para o aparecimento de doenças desde as primeiras semanas após o nascimento até a vida adulta (DABELEA et al., 2000; MANDERSON et al., 2002; BARKER; BAGBY, 2005). O diabetes na gravidez aumenta os riscos de prematuridade, aborto e de má-formação congênita (CASSON et al., 1997; JENSEN et al., 2004), as quais resultam de defeitos do desenvolvimento ocorridos durante a organogênese precoce (FUHRMANN et al., 1983), que incluem a síndrome de regressão caudal e anormalidades urogenitais, que podem ser tão graves quanto a agenesia renal (LUCAS et al., 1997; LYNCH; WRIGHT, 1997; NOLD; GEORGIEFF, 2004). Apesar de existirem numerosos estudos sobre o efeito do diabetes em mulheres grávidas, pouco ainda se sabe sobre as consequências a longo prazo da exposição intrauterina ao diabetes materno na descendência (FETITA et al., 2006; MAGATON et al., 2007; ROCHA et al., 2005).

Atualmente se sabe que um ambiente intrauterino hiperglicêmico pode interferir no desenvolvimento fetal, alterando mecanismos de regulação homeostática em longo prazo (ROSS et al., 2007). Por exemplo, ratos adultos provenientes de mães diabéticas apresentam intolerância à glicose e resistência à insulina (FUJISAWA et al., 2007; GRILL et al., 1991), além de aumento na concentração de moléculas de adesão, alterações metabólicas e uma maior predisposição ao desenvolvimento de doenças vasculares (MANDERSON et al. 2002). Além disso, Amri et al. (1999) demonstraram que em ratos, a exposição do feto à hiperglicemia materna diminui a nefrogênese, reduzindo o número de néfrons e predispondo a prole ao desenvolvimento de insuficiência renal crônica na vida

adulta. Assim, indivíduos expostos à hiperglicemia durante a vida intrauterina podem desenvolver, quando adultos, doenças como, obesidade, DM tipo 2 e hipertensão arterial (DABELEA et al., 2000; GOMES; GIL, 2011; PAGE et al., 2014; PETTITT et al., 2008; JONES et al., 2012; WICHI et al., 2005).

Alterações funcionais na vasculatura representam um dos principais fatores associados à elevação crônica da pressão arterial em descendentes adultos de ratos fêmeas diabéticas (PORTO et al., 2010; RAMOS-ALVES et al., 2012a; ROCHA et al., 2005; SIMEONI; BARKER, 2009; VAN HUYEN et al., 2010; VESSIÈRES et al., 2016). A exposição intrauterina à hiperglicemia materna induz disfunção vascular em artérias de condutância de ratos, caracterizada por um prejuízo da resposta vasodilatadora dependente do endotélio (acetilcolina) e por uma resposta a agentes vasoconstritores (noradrenalina, fenilefrina) aumentada. Além disso, em um estudo publicado por Duong et al. (2010), foi demonstrado que a aorta torácica de ratos provenientes de mães diabéticas apresenta um perfil gênico em favor da vasoconstrição, o qual foi caracterizado por uma redução da expressão do receptor de um importante agente vasodilatador, a prostaciclina (PGI_2). A disfunção endotelial em pequenos vasos de resistência da prole de ratos fêmeas diabéticas também foi descrita. Da mesma forma que em vasos de condutância, esta disfunção é caracterizada por um prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio e por um aumento da vasoconstrição aos agonista alfa-adrenérgicos (HOLEMANS et al., 1999; RAMOS-ALVES et al., 2012a; ROCHA et al., 2005).

Estudos mais detalhados sobre os mecanismos que causam a hipertensão arterial são de grande importância, uma vez que ela é um determinante crucial para o desenvolvimento e progressão das complicações macro e microvasculares do diabetes mellitus e também em indivíduos que foram expostos à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina. Ademais, ressalta-se que uma vez instaladas, estas alterações vasculares também predis põem o indivíduo a outras complicações que são comuns em pacientes diabéticos e/ou hipertensos (ROSEI; RIZZONI, 2010; SCHIFFRIN, 1997), a exemplo do acidente vascular cerebral (COLLINS; ANDERSEN, 1978), da isquemia miocárdica (BRUSH et al., 1988; HASDAI et al., 1997) e da insuficiência renal crônica (KLAHR; MORRISSEY, 2003). Ainda que a etiologia da elevação da pressão arterial permaneça desconhecida na maioria dos casos, a resistência periférica total aumentada é uma das características principais

da hipertensão (LUND-JOHANSEN, 1983). Esta resistência periférica exacerbada resulta no aumento da dissipação de energia que ocorre quando o sangue flui através das pequenas artérias de resistência com o lúmen reduzido. O conceito de artérias de resistência pode ser definido como vasos pré-arteriolares que contribuem passivamente e ativamente para a manutenção da resistência vascular basal e para o controle do fluxo sanguíneo durante alterações hemodinâmicas (MULVANY, 2003).

Em muitos casos patológicos, como na hipertensão, as artérias de resistência têm um papel fundamental na etiologia desta enfermidade (FOLKOW, 1990; FOLKOW, 1997; GRIYBY; THULESIUS, 1958; MULVANY, 1987) e alguns autores sugerem que o desenvolvimento de anormalidades nestes vasos poderia ser causa primária em tais processos (KORNER; ANGUS, 1997). Os principais fatores que contribuem para o aumento da resistência periférica na hipertensão arterial são: as alterações das respostas vasoconstritora e vasodilatadora, as alterações mecânicas da parede arterial e o remodelamento vascular (SEDEEK et al., 2009).

2.4 ESTRUTURA DOS VASOS DE RESISTÊNCIA: CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS

A estrutura dos vasos sanguíneos varia consideravelmente ao longo do sistema cardiovascular. Comparadas com as artérias de condutância, as artérias de resistências (com diâmetro do lúmen entre 100 e 500 μm) apresentam parede arterial mais espessa em proporção ao diâmetro interno, maior proporção de células musculares lisas e menor proporção de material elástico (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001; MULVANY; AALKJAER, 1990). Assim como os vasos de condutância, os de resistência são basicamente compostos pelas túnicas íntima, média e adventícia (Figura 1).

2.4.1 Túnica íntima. É a camada mais interna do vaso e por causa da sua localização está em contato direto com o sangue circulante. A partir do lúmen, a túnica íntima é composta pelas células endoteliais, que desempenham um papel importante na definição do padrão vascular embrionário e no recrutamento de células musculares lisas para a parede vascular (BAX et al., 2003; RISAU; FLAMME, 1995; SURJ et al., 1996). As células endoteliais das pequenas artérias, semelhante à

de outros vasos, têm uma estrutura escamosa e formam uma cobertura contínua. Elas produzem e aderem a uma lâmina basal que é apoiada pela lâmina elástica interna (LEI) ou é separada da LEI por um material amorfo e por “filamentos de ancoragem e conexão” que são formadas de microfibrilas contendo fibrilina e fibras de colágeno (BRIONES et al., 2003; DAVIS, 1993; GERRITY; CLIFF, 1972; SCHWARTZ; BENDITT, 1972).

A capacidade das células endoteliais de produzir elastina indica que elas contribuem para a formação da LEI (CARNES; ABRAHAM; BUONASSISI, 1979; DAMIANO et al., 1984; CANTOR et al., 1980), talvez em resposta a um sinal de células da túnica média (MECHAM et al., 1983; WAGENSEIL; MECHAM, 2009). Em condições normais, a elastogênese é restrita à vida fetal e à infância, e as fibras elásticas maduras devem durar por toda a vida de um indivíduo (XU; SHI, 2014). A meia-vida da elastina é da ordem de 40 anos. Portanto, as fibras elásticas são consideradas o elemento mais duradouro da matriz extracelular (MEC) (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006). O endotélio controla o intercâmbio de substâncias com os tecidos subjacentes e possui uma intensa atividade metabólica que exerce influência significativa sobre o tônus vascular. Do ponto de vista clínico, a camada íntima é particularmente importante na fisiopatologia da aterosclerose e da restenose.

2.4.2 Túnica média. Em vasos de resistência, a camada média constitui aproximadamente 70 a 80 % do volume total da parede arterial (MILLER et al., 1987; WALMSLEY; OWEN; BEVAN, 1983). É formada por células musculares lisas, as quais se encontram circunferencialmente arranjadas ao longo do eixo arterial, e de uma MEC rica em elastina, colágeno (principalmente do tipo I, III e IV) e proteoglicanos. Além da função de servir como suporte muscular da parede arterial, esta camada se encarrega da atividade vasomotora, uma vez que as células musculares lisas possuem capacidade contrátil. Esta camada é limitada exteriormente pela lâmina elástica externa (LEE) e internamente pela LEI. A quantidade de camadas de células musculares lisas é diretamente proporcional ao diâmetro do vaso (WALMSLEY; OWEN; BEVAN, 1983). Sendo assim, artérias com diâmetro por volta de 300 µm possuem aproximadamente seis camadas de células musculares lisas na camada média, enquanto aquelas com diâmetro entre 30-50 µm possuem apenas uma única camada (GATTONE; MILLER; EVAN, 1986; MILLER et

al., 1987). A comunicação entre as células musculares lisas e o endotélio ocorre através das fenestras da LEI (RHODIN, 1980).

2.4.3 Túnica adventícia. É a camada mais externa da parede do vaso. Geralmente ela é definida como a área externa da LEE e consiste de uma MEC rica em colágeno produzida por uma população heterogênea de células miofibroblásticas (KARRER, 1961; STENMARK, 2006). O elevado conteúdo relativo de colágeno da adventícia ajuda a prevenir a ruptura vascular a pressões extremamente altas (BURTON, 1954). Este tecido conjuntivo se prolonga gradualmente relacionando-se com estruturas vizinhas, e está separado da camada média por uma membrana denominada LEE. Neste tecido conjuntivo perivascular encontra-se uma rede de vasos de calibre muito pequeno conhecida como *vasa vasorum*, cuja função está relacionada com o metabolismo da parede vascular. Por causa dessa rede vascular única, a adventícia é um local proeminente de inflamação vascular. Estudos recentes mostraram que a adventícia pode ser um único compartimento de detecção de lesão da parede do vaso (SCHULZE-BAUER; REGITNIG; HOLZAPFEL, 2002; STENMARK, 2006) e, em vasos sanguíneos maduros, contém células progenitoras residenciais capazes de se diferenciar em células do músculo liso que repovoam a média e a íntima (HU et al., 2004; PASSMAN et al., 2008; TORSNEY; HU; XU, 2005). Na camada adventícia também pode ser encontrada uma rede de fibras nervosas perivasculares (HIRST; EDWARDS, 1989).

2.4.4 Matriz extracelular. Além da função estrutural de suporte às células da parede vascular, a MEC também está implicada na mecânica e na função vascular. Ela responde por propriedades de elasticidade e de resistência ao estiramento do vaso. É sintetizada por todos os tipos de células da parede do vaso e é composta por fibras colágenas e elásticas embebidas em um gel viscoelástico de proteoglicanos, hialuronano e água, juntamente com numerosas glicoproteínas multifuncionais (laminina, fibronectina, tenascina, trombopondina) (ARENAS; DE ZURBARÁN, 2002). Esses componentes estruturalmente diferentes interagem por emaranhamento e *cross-link* para formar um polímero bioativo, que, em parte, regula as propriedades biomecânicas do vaso e o fenótipo das células vasculares. A quantidade de cada componente é relativamente definida pelo tipo de tecido, mas essas proporções podem mudar em casos de doença vascular (EBLE; NILAND, 2009; SONOYAMA et al., 2007; WAGENSEIL; MECHAM, 2009; WIGHT, 2008).

Cada um realiza funções de maneira integrada com os demais; isso torna a matriz qualificada como um verdadeiro complexo funcional. O colágeno e a elastina constituem a arquitetura da MEC. As glicoproteínas operam como moléculas de adesão do substrato intercelular, importantes nas interações célula-célula e célula-matriz. Glicosaminoglicanos e proteoglicanos têm papel fundamental no balanço eletrolítico e ácido-básico (ALBERTS et al., 1989). Estes componentes representam fatores determinantes para as características mecânicas da parede vascular e, juntamente com os componentes celulares de cada camada, participam da regulação de processos celulares – como adesão, migração e proliferação celular – influenciando dessa maneira a estrutura da parede vascular.

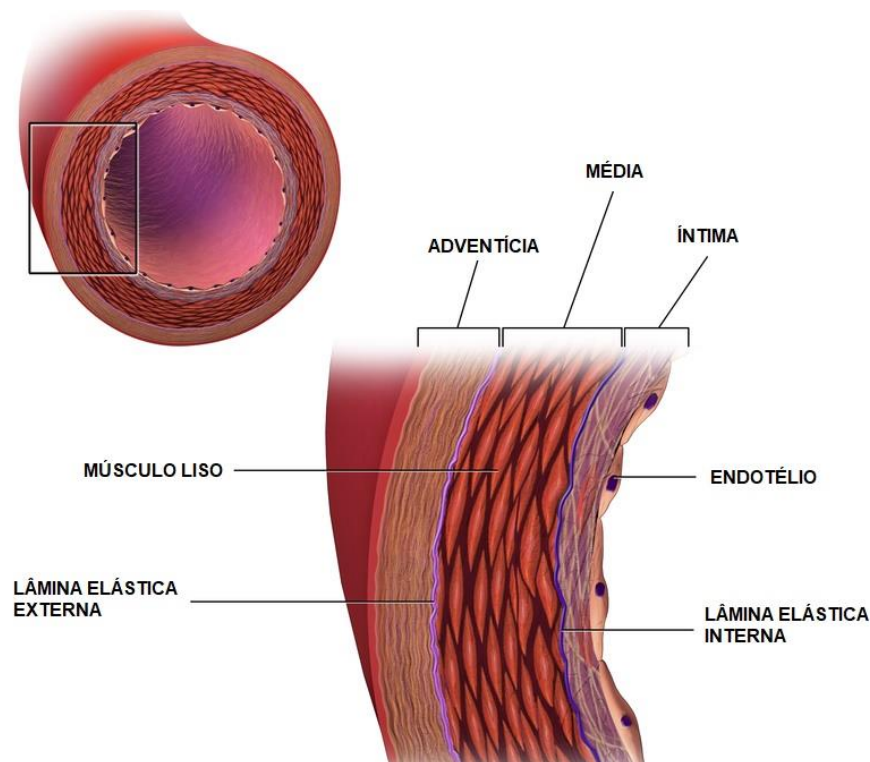


Figura 1. Esquema representativo de uma artéria de resistência mostrando os vários constituintes que formam a parede arterial (Modificado de Blausen.com staff, 2014).

2.4.4.1 Colágeno. O colágeno é uma proteína de sustentação, muito rígida e tem o papel fisiológico de limitar a distensão do vaso. É formada da associação de três cadeias polipeptídicas com uma formação característica de tripla hélice. Ele inclui pelo menos 24 subtipos diferentes e aproximadamente 38 cadeias polipeptídicas distintas (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001), dependendo da função e da estrutura do vaso. Diversos tipos de células expressam diferentes tipos de

colágeno. No sistema vascular tem sido identificado pelo menos 13 tipos de colágeno, os quais contribuem para a manutenção da estrutura e integridade da parede vascular e representa importante papel em vários eventos celulares incluindo adesão, migração e proliferação celular (PLENZ et al., 2003).

Os colágenos I, III e V são colágenos formadores de fibrilas, sendo os tipos I e III os principais responsáveis por transmitir força à parede do vaso. Na parede arterial normal e lesada, os colágenos I e III são os principais tipos encontrados nas camadas média e adventícia (WALKER-CAPRIOGLIO et al., 1992), enquanto os tipos IV e VIII estão localizados na membrana basal e ao redor das células musculares lisas (YURCHENCO, 1990). Em menor proporção também se encontra o colágeno do tipo V, o qual participa na formação de heteropolímeros e seu papel parece estar relacionado com a regulação do diâmetro das fibras colágenas (YURCHENCO, 1990). O colágeno tipo VI tem também um pequeno papel em vasos sanguíneos e aparece nas artérias entre o colágeno do I e III associado a proteoglicanos; sua função parece estar relacionada aos processos de adesão às células vasculares (BIDANSET et al., 1992). As fibras colágenas praticamente não se estiram, o que torna a principal diferença em relação às fibras elásticas.

2.4.4.2 Elastina. As fibras elásticas são os principais conjuntos de MEC insolúvel que conferem resiliência aos tecidos conjuntivos, permitindo deformabilidade de longo alcance e recuo passivo sem aporte de energia (KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002). Estas são estruturas complexas formadas por elastina associada a glicoproteínas hidrofílicas (microfibrilas de fibrilina) e enzimas responsáveis pelo entrecruzamento dos seus peptídeos. Diferentes proporções de elastina e microfibrilas promovem características funcionais variáveis, adaptáveis às necessidades locais dos tecidos (KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002).

A elastina é um componente importante da MEC de artérias de resistência, embora, em relação ao colágeno, sua proporção é bem menor comparada aos vasos de condutância (artérias elásticas). Estas fibras estão organizadas como “lâminas” concêntricas fenestradas ou lamelas que separam as diferentes camadas da parede vascular. A elastina é restrita a uma LEI fenestrada e a redes de fibras elásticas em partes da adventícia e da média – LEE (BRIONES et al., 2003). A LEI é uma estrutura organizada, formada por fenestrações regularmente distribuídas, as

quais permitem a passagem de nutrientes e de outras substâncias do sangue para a parede vascular, e em sentido inverso. Já a LEE, ao contrário da interna, encontra-se fragmentada ou em alguns casos ausente em pequenas artérias de resistência (WALKER-CAPRIOGLIO et al., 1992). Fibras elásticas e colágenas interconectam as lâminas elásticas formando uma rede contínua com estrutura helicoidal tridimensional na qual as fibras são orientadas em uma direção quase circunferencial (O'CONNELL et al., 2008).

A elastina é sintetizada a partir de uma molécula solúvel precursora chamada tropoelastina, sintetizada principalmente pelas células musculares lisas (MARTIN et al., 1992; PARKS; DEAK, 1990) junto com uma proteína de 67 kDa associada à superfície celular através de uma proteína de membrana específica (HINEK et al., 1991). Esta proteína de 67 kDa possui sítios de ligação à lecitina que interage com proteínas microfibrilares e ainda um domínio hidrofóbico que une sequências hidrofóbicas dentro do peptídeo de elastina.

2.4.4.3 Outros componentes da matriz extracelular. Diversos componentes adicionais da MEC também afetam a complacência e as habilidades reguladoras dos vasos sanguíneos. Um exemplo é fibronectina. O conteúdo de fibronectina nos vasos sanguíneos é particularmente importante, não apenas porque modifica o módulo elástico e o estresse da parede (BÉZIE et al., 1998; MARTINEZ-LEMUS; HILL; MEININGER, 2009), mas também porque alguns estudos indicam que ela está intimamente associada à capacidade das células do músculo liso vascular de arteríolas de detectar e reagir às forças mecânicas através de receptores de integrinas (MARTINEZ-LEMUS; HILL; MEININGER, 2009). A deposição de fibronectina na MEC controla a deposição, organização e estabilidade de outras moléculas da matriz, incluindo os colágenos do tipo I e III e a trombospondina (uma glicoproteína), além de modular a infiltração de leucócitos, expressão de moléculas de adesão, proliferação celular e modulação fenotípica de células do músculo liso. Todos estes são os fatores envolvidos no remodelamento vascular em decorrências de alguns processos patológicos (CHIANG et al., 2009).

As integrinas são os principais mediadores da comunicação molecular entre uma célula e seu ambiente da MEC (HEERKENS; IZZARD; HEAGERTY, 2007; MARTINEZ-LEMUS et al., 2005). Mudanças no perfil da integrina são importantes para os processos que levam a um rearranjo estrutural mais crônico da parede

vascular e do material da matriz (MARTINEZ-LEMUS; HILL; MEININGER, 2009). Na parede vascular normal, o conteúdo de proteína da MEC é regulado rigidamente pela síntese e degradação. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas que degradam a MEC e as proteínas do tecido conjuntivo. Atualmente seis grupos de MMPs foram identificados e incluem, entre outras, as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), que clivam colágenos intersticiais I, II e III, bem como outras proteínas da MEC (RAFFETTO; KHALIL, 2008). As fibras elásticas podem ser degradadas por MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13) e por elastases (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006; JACOB, 2003), escapando do soro ou secretadas pelas plaquetas infiltrantes, leucócitos e células vasculares ativadas.

Em conjunto com o colágeno e a elastina, estes determinantes da matriz (fibronectina, integrinas, MMPs) são primordiais constituintes para a determinação das propriedades mecânicas e estruturais da parede vascular de artérias de resistência, como demonstrado por Briones et al. (2003).

2.5 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, MECÂNICAS E MIOGÊNICAS DA PAREDE VASCULAR ASSOCIADAS À HIPERTENSÃO ARTERIAL

As artérias mesentéricas de resistência (AMR) contribuem passivamente e ativamente para a manutenção e regulação da resistência vascular e do fluxo sanguíneo na circulação mesentérica. De acordo com a Lei de Poiseuille, a resistência vascular varia inversamente à quarta potência do raio arterial. Desta forma, pequenas mudanças do diâmetro interno podem influenciar marcadamente a resistência vascular periférica. O diâmetro arterial, por sua vez, é determinado pelas propriedades passivas e ativas da parede vascular. As propriedades passivas podem ser descritas pela relação pressão:diâmetro sob condições onde as células musculares lisas estão completamente relaxadas. Já as propriedades ativas dos vasos sanguíneos são determinadas pelo estado contrátil das células musculares lisas, por sua organização e pelo número. Assumindo um determinado grau de ativação de uma célula muscular lisa, e que este produz um dado nível de força por área de secção transversal, a pressão contra a qual um vaso pode contrair (de acordo com a Lei de Laplace) será proporcional à relação parede:lúmen (ou mais corretamente à relação média:lúmen) (MULVANY, 1984). A característica estrutural primária dos vasos é dessa maneira determinada pelo diâmetro interno e pela

espessura da parede (ou da camada média), medidas sob condições de total relaxamento das células musculares lisas e sob uma dada pressão intravascular. De acordo com o diâmetro e a espessura da parede, um outro parâmetro que pode ser medido é a área de secção transversal. A medida deste parâmetro é importante por indicar a quantidade de material que compõe a parede vascular e, sendo assim, fornecer informação sobre processos biológicos, os quais determinam a estrutura vascular, como crescimento ou regressão celular.

Além de fatores hemodinâmicos, como fluxo e pressão, a parede vascular é constantemente exposta a uma variedade de fatores humorais incluindo fatores de coagulação, peptídeos vasoativos, citocinas, fatores de crescimento e alguns hormônios. A mudança do balanço homeostático entre esses fatores induz alterações adaptativas na estrutura, na mecânica e na função vascular, processos esses que podem causar redução do lúmen do vaso, uma causa fundamental de aumento da resistência periférica em algumas doenças como a hipertensão essencial e secundária (AGABITI-ROSEI, 2003; HEAGERTY, 2007; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000) e também no diabetes mellitus do tipo 1 (DM tipo 1) e 2 (GREENSTEIN et al., 2009; LEVY et al., 2008).

Como comentado anteriormente, a exposição intrauterina ao diabetes mellitus provoca uma maior incidência de alterações cardiovasculares na prole adulta, especialmente a hipertensão arterial (BUNT; TATARANNI; SALBE, 2005; NEHIRI et al., 2008; ROCHA et al., 2005; WICHI et al., 2005). A fisiopatologia desta doença, em indivíduos expostos ao diabetes materno ou não, é complexa e multifatorial. Envolve mecanismos que normalmente regulam a pressão arterial sistêmica, como a função cardíaca, o sistema nervoso autônomo, o sistema renina-angiotensina e os mecanismos funcionais e estruturais da vasculatura (IZZARD et al., 2005; SCHIFFRIN, 2012; SCHIFFRIN; TOUZY, 2004).

Existem duas características da vasculatura amplamente reconhecidas na hipertensão essencial: o estreitamento interno das artérias de resistência e o enrijecimento das grandes artérias, que aumentam a resistência periférica e comprometem a complacência vascular, respectivamente. Ambas são reconhecidas por contribuir para a morbidade e mortalidade associada à hipertensão (ET-TOUZY; SAFAR; PLANTE, 2003; RIZZONI et al., 2003a). Apesar de décadas de estudo, o conhecimento das causas iniciais que levam a essas anormalidades vasculares

ainda não está completamente elucidado. Ademais, permanece a questão se essas anormalidades existem antes e, portanto, participam das fases iniciais da elevação da pressão arterial, ou se são uma consequência disso.

As alterações da estrutura dos vasos de resistência e de condutância associadas a algumas doenças, dentre elas a hipertensão arterial, são normalmente conhecidas como “remodelamento vascular” (MULVANY, 2002, 2003). Este é caracterizado pela reorganização dos componentes celulares e extracelulares da parede arterial em resposta a um estímulo crônico, como por exemplo, o aumento de fluxo sanguíneo, o aumento da pressão transmural e/ou por eventos inflamatórios e oxidativos (GIBBONS; DZAU, 1994). A resposta final seria manter tensões de parede e/ou cisalhamento relativamente constantes (DE MEY et al., 2005; LANGILLE, 1991), o que poderia explicar as respostas hipertróficas da parede arterial em alguns modelos de hipertensão arterial. De acordo com a Lei de Laplace, a pressão transmural elevada aumenta o estresse de parede, que, por sua vez, estimula o crescimento da parede vascular levando a um aumento da área de secção transversal, redução do diâmetro interno e a normalização do estresse (MULVANY, 2002). Em contrapartida, a diminuição do fluxo sanguíneo reduz o diâmetro da artéria de resistência e a área da parede (COATS et al., 2003; DE MEY et al., 2005). Estas alterações estruturais podem inicialmente ser adaptativas, mas se tornam mal adaptativas e comprometem a função dos órgãos, contribuindo para as complicações cardiovasculares (PASTERKAMP; DE KLEIJN; BORST, 2000).

Mulvany (1996) propôs uma terminologia para classificar o remodelamento vascular baseado no diâmetro interno e na área de secção transversal do vaso, podendo ser denominado de remodelamento hipotrófico (quando ocorre redução da área de secção transversal da parede arterial), eutrófico (quando há somente um rearranjo dos constituintes da parede vascular, sem mudanças da área de secção transversal) ou hipertrófico (quando há um aumento da área de secção transversal da parede arterial). Esses processos ainda estão associados à nomenclatura referente ao diâmetro interno que engloba remodelamento “para dentro” (com redução do diâmetro interno) ou “para fora” (com aumento do diâmetro interno) (MULVANY 1996) (Figura 2).

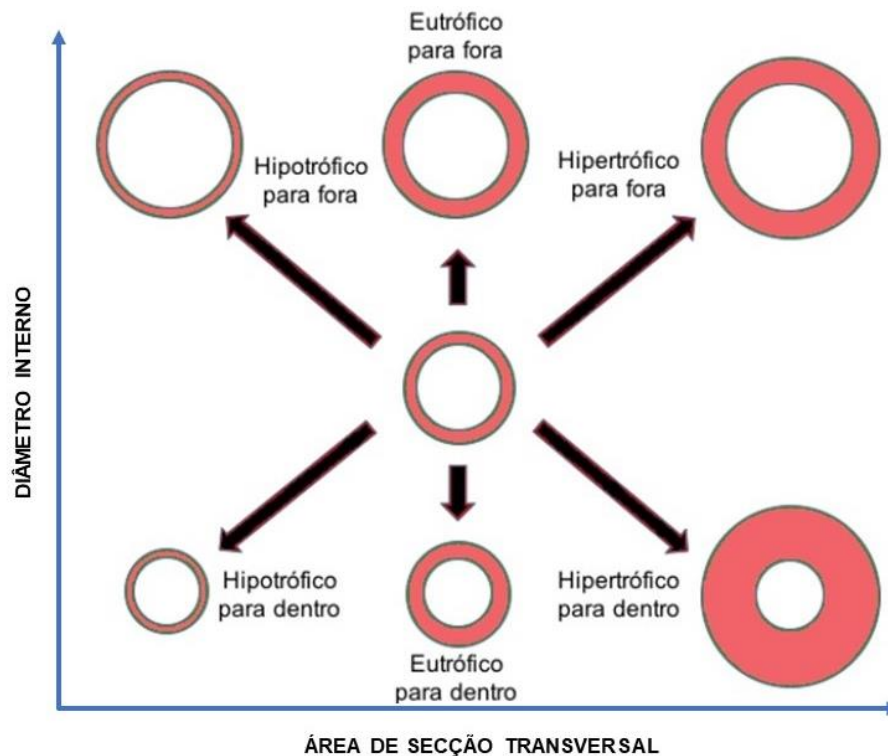


Figura 2. A figura representa as diversas maneiras em que o remodelamento vascular pode modificar as seções transversais dos vasos sanguíneos. O ponto de partida é o vaso no centro. O remodelamento pode ser hipertrófico (quando há aumento da área de secção transversal, vasos representados na parte direita superior e inferior da figura), hipotrófico (com redução da área de secção transversal indicados na parte esquerda superior e inferior da figura) ou eutrófico (sem mudanças na área de secção transversal, vasos representados ao centro da figura). Quanto ao diâmetro do vaso, quando há redução do diâmetro (parte inferior na figura) é considerado “para dentro” e quando há aumento do diâmetro interno (parte superior na figura) indica que o remodelamento é “para fora”. Adaptado de MULVANY, 1999.

Em artérias de resistências de pacientes com hipertensão essencial, assim como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não foram encontrados sinais de hipertrofia ou hiperplasia da camada média muscular (ARRIBAS et al., 1997; BRIONES et al., 2003; INTENGAN et al., 1999b; LI et al., 1996). Nestes, as células musculares lisas parecem rearranjar-se em volta de um lúmen arterial reduzido, e isso é acompanhado por uma deposição aumentada de MEC (BRIONES et al., 2003; INTENGAN et al., 1999a, 1999b; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000; RIZZONI et al., 2003a). Este tipo de remodelamento é conhecido como remodelamento eutrófico para dentro, ou seja, sem mudanças na quantidade total de material da parede do vaso (MULVANY, 1999) (Figura 2). Algumas hipóteses podem explicar estas alterações, como a manutenção do volume da camada média que poderia envolver

uma combinação de processos de crescimento celular no interior e de apoptose no exterior do vaso, reduzindo simultaneamente o diâmetro interno e externo, respectivamente (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). Este remodelamento pode ser encontrado ainda em modelos experimentais de hipertensão como, o Dois Rins Um Clipe (LI et al., 1996) e a hipertensão induzida por angiotensina II (ANG II) (BRIONES et al., 2009).

Embora a camada média, composta por células musculares lisas e pela MEC, tenha um maior enfoque quando o assunto é remodelamento vascular, a adventícia e o endotélio também apresentam papel fundamental no crescimento e no reparo celular (MCGRATH et al., 2005). A adventícia é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), que regula o estresse oxidativo, tornando assim esta camada uma efetiva participante na liberação de citocinas e difusão das espécies reativas, ambas podendo influenciar a estrutura e a função das células do músculo liso (REY; PAGANO, 2002; TOUYZ, 2005). Já o endotélio serve como sensor para fatores hemodinâmicos e humorais, além de moderador deste sinal para as células do músculo liso vascular, as quais possuem papel chave no processo de remodelamento (TOUYZ, 2005).

O remodelamento hipotrófico, por sua vez, está associado a uma redução da quantidade de material em torno da parede do vaso (ou seja, área de secção transversal diminuída) (MULVANY, 1999) (Figura 2). Este tipo de remodelamento pode estar relacionado com processos de apoptose e/ou rearranjo do material ao redor da circunferência do vaso. Tem sido descrito em vários modelos, dentre eles em arteríolas renais aferentes de SHR pré-hipertensos (NØRRELUND et al., 1994) e nas AMR de animais hipertensos pela administração de ouabaína (BRIONES et al., 2006). Remodelamento hipotrófico também tem sido descrito por Langille et al. (1989) em artérias coronárias de coelhos, o qual pode ser produzido por alterações funcionais. Além destes, artérias de resistência isoladas de pacientes com isquemia de membros inferiores (COATS et al., 2003), um modelo de hipotensão/ baixa perfusão, apresentaram também este tipo de remodelamento. O mecanismo deste tipo de remodelamento não está claro, porém, a atrofia de uma ou mais camadas da parede vascular, devido à diminuição da densidade celular ou aumento da rigidez da parede, parece contribuir.

Já o remodelamento hipertrófico geralmente se apresenta por um crescimento da túnica média do vaso sanguíneo e/ou por uma maior deposição de MEC (MCGRATH et al., 2005). (Figura 2). Este crescimento pode ser devido ao aumento do número e/ou tamanho das células musculares lisas (MULVANY; BAANDRUP; GUNDERSEN, 1985), o que pode resultar em hiperreatividade aos agentes vasoconstritores (BOHR; WEBB, 1984; LEE; SMEDA, 1985; TRIGGLE; LAHER, 1985). A elastina e o colágeno são as principais proteínas que têm um papel de destaque na colaboração para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial, por agir no remodelamento e na rigidez vascular (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006) (Figura 3). Este remodelamento predomina em pacientes com hipertensão secundária (RIZZONI et al., 2000), no modelo animal de hipertensão DOCA-Sal (DENG; SCHIFFRIN, 1992), Um Rim Um Clipe (DENG; SCHIFFRIN, 1991; KORSGAARD; MULVANY, 1988), Dahl-Sal Sensível (D'USCIO et al., 1997) e em pacientes com DM tipo 2 (RIZZONI et al., 2001b).

A maioria dos estudos sobre o remodelamento vascular em animais hipertensos têm focado em alterações no conteúdo do colágeno. Contudo, a partir de 2003, um estudo realizado por Briones et al. (2003) demonstrou que a elastina também é um determinante importantes das dimensões vasculares. Estes autores observaram que artérias mesentéricas de resistência de SHR apresentavam aumento da quantidade relativa de elastina na LEI associado a uma redução do tamanho das fenestras e que estas alterações funcionavam como um elemento importante para a redução do diâmetro interno, o aumento da relação parede:lúmen e a maior rigidez arterial, comumente observados nas artérias destes animais (BRIONES et al., 2003).

A rigidez e a geometria dos componentes da parede, assim como a pressão transmural na qual estão expostos os vasos, causam as alterações da distensibilidade arterial (BRIONES et al., 2009; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). Em particular, o colágeno e a elastina estão diretamente associados com a maior rigidez da parede vascular observada em animais hipertensos (BRIONES et al., 2003, 2009). Rigidez, distensibilidade e complacência são termos que têm sido empregados para quantificar as propriedades elásticas das artérias (O'ROURKE, 1995). A complacência arterial é definida como a variação de volume para uma determinada mudança de pressão transmural, expressando as capacidades de

tamponamento do sistema arterial (YIN; TING, 1992). Isso depende do tamanho do lúmen e das propriedades elásticas da parede vascular. Uma redução do diâmetro interno resultante principalmente do remodelamento vascular pode diminuir a complacência. Entretanto, esta pode ser normalizada pela diminuição da rigidez dos componentes da parede arterial (INTENGAN et al., 1999a). Contudo, o módulo elástico é independente da geometria e depende basicamente da rigidez dos componentes da parede vascular. De tal modo, a elasticidade arterial é determinada pela combinação do módulo elástico dos componentes da parede vascular como: tecido conectivo, elastina, fibras colágenas, células musculares lisas e endoteliais. A distensibilidade pode ser corrigida em relação ao tamanho do lúmen e depende da massa e das propriedades elásticas intrínsecas da parede do vaso (YIN; TING, 1992). As consequências da redução da distensibilidade para o fluxo sanguíneo regional não são evidentes, porém sabe-se que a redução da distensibilidade pode contribuir para o estreitamento do lúmen de pequenas artérias em elevados níveis de pressão arterial, provocando um aumento na resistência periférica total e reduzindo o fluxo sanguíneo para os órgãos-alvo. Entretanto, de acordo com Folkow (1995), o desenho geométrico e a distensibilidade das pequenas artérias tendem a ser alterados na medida ideal, de modo que, com mudanças comuns na atividade da musculatura lisa, uma faixa de fluxo normal é mantida, apesar das elevações nas pressões de perfusão e transmural e na resistência.

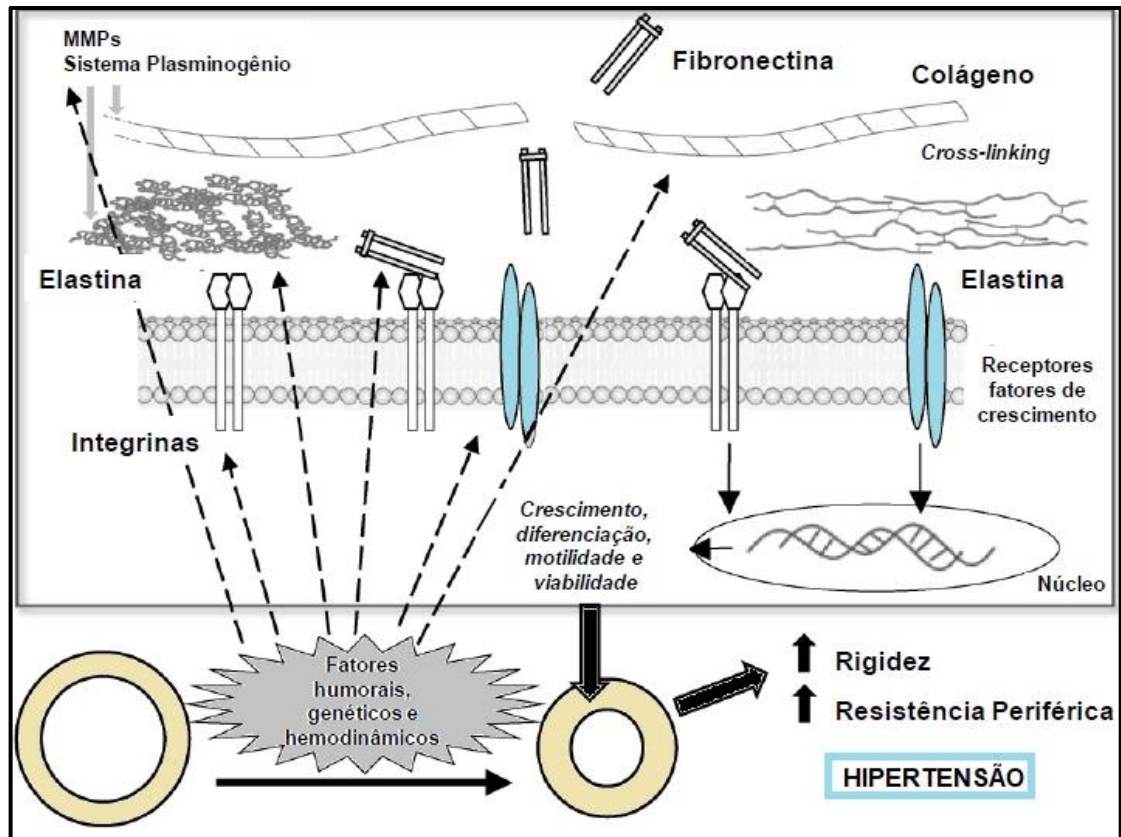


Figura 3. Fatores humorais, genéticos e hemodinâmicos afetam as diversas proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina, fibronectina, entre outras) por modificações na síntese e na montagem ou degradação pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) ou pelo sistema plasminogênio. Desta forma, resultando em alterações patológicas na quantidade e na estrutura tridimensional da matriz extracelular, promovendo enrijecimento dos vasos, que, por sua vez, é responsável, pelo menos em parte, pelo estreitamento da vasculatura em estados hipertensos e, portanto, facilita o aumento da resistência periférica e da alta pressão sanguínea. Além das modificações nas propriedades mecânicas, o envolvimento dos componentes da MEC na sinalização celular via receptores de integrina modula a adesão celular, a proliferação e a troca fenotípica, que também podem participar do remodelamento vascular da hipertensão (Modificado de BRIONES; ARRIBAS; SALAICES, 2010).

É importante citar que nem sempre as alterações vasculares estruturais decorrentes da hipertensão arterial podem ser explicadas por alterações das propriedades mecânicas da parede arterial (GRIBBIN; PICKERING; SLEIGHT, 1979). Segundo Baumbach e Hadju (1993), as pequenas artérias cerebrais de animais hipertensos não demonstraram modificação em suas propriedades mecânicas quando comparadas a outros leitos vasculares. Além disso, demonstrou-se que a rigidez arterial se apresenta reduzida em alguns leitos vasculares de animais e de pacientes hipertensos, mesmo estas artérias apresentando redução do lúmen arterial, aumento na espessura da parede vascular e da relação parede:lúmen

ou aumento da relação colágeno:elastina (BUND, 2001; HAJDU; BAUMBACH, 1994; INTENGAN et al., 1999a).

As alterações estruturais nos pequenos vasos arteriais tornam-se ainda mais pronunciadas em pacientes acometidos de hipertensão e diabetes mellitus, sugerindo que o agrupamento de fatores de risco pode ter efeitos deletérios sinérgicos sobre a vasculatura (RIZZONI et al., 2001a). Uma consequência fisiopatológica e clínica importante da presença de alterações estruturais nas pequenas artérias de resistência e arteríolas pode ser uma diminuição da reserva vasodilatadora (FOLKOW, 1982). De fato, tal como mencionado acima, alguns tipos de remodelamento arterial se caracterizam por um estreitamento do lúmen, o que aumenta a resistência ao fluxo, mesmo com máxima dilatação, isto é, na ausência do tônus muscular. A correlação entre a reserva de fluxo coronariano e o remodelamento tem sido observado em pacientes hipertensos, o que sugere que as alterações estruturais nas pequenas artérias de resistência podem estar presentes ao mesmo tempo em diferentes leitos vasculares, incluindo os de grande importância clínica, como a circulação coronária e cerebral (RIZZONI et al., 2003b). Prejuízo da resposta hiperêmica (o que pode refletir uma reserva de fluxo alterada) tem sido relatado em crianças e adultos com diabetes mellitus (SHORE et al., 1991; STRAIN et al., 2005). Portanto, alterações estruturais da microcirculação pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de lesões de órgãos, não só na hipertensão, mas também no diabetes mellitus. De fato, um relevante papel prognóstico do aumento da relação parede:lúmen de artérias da circulação subcutânea em populações de alto risco cardiovascular (incluindo indivíduos diabéticos, hipertensos ou não) foi previamente demonstrado (RIZZONI et al., 2003a). Mais recentemente, estes dados foram reavaliados, considerando características do remodelamento vascular.

A resposta miogênica de pequenas artérias é um outro importante determinante da resistência vascular periférica e, em última instância, da pressão arterial. Esta resposta condiciona um aumento do tônus do músculo vascular liso quando a pressão transmural aumenta. O estímulo deste processo é o estiramento dos próprios miócitos. A resposta traduz-se numa contração do músculo liso, que permite que o aumento da pressão transmural (decorrente de um aumento da

pressão intravascular) verificado a montante não se transmite a jusante para a rede capilar (DAVIS; HILL, 1999). Como tal, permite manter o fluxo sanguíneo constante e, conseqüentemente, os níveis de perfusão inalterados no leito capilar. A resposta miogênica independe de influências neurais, metabólicas e/ou hormonais. Devido a uma estreita relação entre o tônus vascular e a estrutura da parede (BAKKER et al., 2002), as modificações do tônus são capazes de induzir uma adaptação estrutural dos vasos. É bem conhecido que a vasoconstrição persistente induz remodelamento para dentro em vários tipos de artérias (BAKKER et al., 2002, 2004, 2005). De tal modo, alterações da resposta miogênica poderiam não apenas estar envolvidas no desenvolvimento da hipertensão, mas também ter impacto na estrutura vascular.

A deterioração da resposta miogênica pode ter um papel importante no desenvolvimento do remodelamento vascular em pacientes com elevado risco cardiovascular (IZZARD et al., 2005; RIZZONI et al., 2001b). Além disso, a diminuição da resposta miogênica pode levar a um aumento do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo com conseqüentes aumentos da pressão capilar, da permeabilidade e do extravasamento capilar, os quais podem provocar lesão tecidual. Alguns dados confirmam aumento da pressão capilar em pacientes com diabetes mellitus (PARVING et al., 1983), especialmente se eles são também hipertensos (FEGAN et al., 2003).

2.6 MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO REMODELAMENTO VASCULAR

O remodelamento vascular é um processo regulado por inúmeros mecanismos inter-relacionados que incluem: proliferação e diferenciação das células do músculo liso vascular, degradação e ruptura das fibras elásticas e deposição de componentes da MEC (VAN VARIK et al., 2012). A MEC é responsável pelas propriedades biomecânicas passivas, proporcionando aos vasos sanguíneos resistência mecânica, resiliência e compressibilidade. Portanto, alterações na composição ou disposição espacial de seus elementos podem alterar tanto a estrutura como a mecânica da parede vascular. De fato, a hipertensão arterial e o diabetes são condições que estão associadas a múltiplas toxicidades metabólicas e

estímulos crônicos prejudiciais que quando não estão controlados levam a ativação crônica de diversos processos deletérios e o desequilíbrio da MEC, resultando em fibrose, desarranjo estrutural, disfunção e falência de órgãos e/ou tecidos (HAYDEN; SOWERS; TYAGI, 2005; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001).

Na parede do vaso normal, o conteúdo de proteína da matriz é finamente regulado através da sua síntese e degradação (SONG; ERGUL, 2006). Este conteúdo não só possui a função de ancorar outras proteínas, mas também está envolvido na sinalização da matriz devido à interação com a família de integrinas, promovendo sinalização de fatores de crescimento. O controle destas proteínas é feito pelas MMPs (SELLERS; WOESSNER JR, 1980; VISSE; NAGASE, 2003; WANG; KHALIL, 2018). A diminuição da atividade destas contribui para a redução da degradação e consequentemente para o acúmulo da MEC em tecidos vasculares e renais de pacientes diabéticos (XU et al., 2014), assim como de pacientes hipertensos (ERGUL et al., 2004; LAVIADES et al., 1998; ZERVOUDAKI et al., 2003). Sabe-se que existe uma precoce ativação das MMPs na hipertensão e no diabetes (AMMARGUELLAT et al., 2002; ERGUL et al., 2003; HARRIS et al., 2005). Por exemplo, estudos usando modelos de camundongos knock-out para MMP-9 mostraram que esta metaloproteinase pode desempenhar um papel fundamental nos estágios iniciais da doença vascular hipertensiva. Verificou-se que o início (dez dias) da hipertensão induzida por Ang II era acompanhado pelo aumento da atividade da MMP-9 nos vasos de condutância, o que estava associado à preservação de mecanismos de adesão aos vasos e a uma resistência ao aumento da pressão arterial. Por outro lado, a ausência de atividade da MMP-9 resulta em aumento da rigidez arterial e aumento da pressão de pulso (FLAMANT et al., 2007). Entretanto, os mecanismos moleculares que levam ao acúmulo ou degradação da MEC em vasos de resistência, assim como a regulação transcricional das proteínas da matriz e MMPs em diferentes leitos vasculares, tanto em modelos de hipertensão como de diabetes, ainda não foram extensivamente estudados.

As MMPs não são encontradas somente na forma secretada no sistema circulatório, elas também são encontradas na forma inativa na MEC chamada de zimogênio ou pró-MMP (MT1-MMP, MMP2 e MMP-3 na superfície celular), até que sejam ativadas pelo ativador de plasminogênio tecidual ou plasminogênio

uroquinase que transforma plasminogênio em plasmina e age diretamente na pró-MMP transformando-a em MMP ativa. Níveis elevados do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) têm um efeito primordial na produção de plasmina e na ativação das MMPs, podendo ser de grande importância no acúmulo da matriz (HAYDEN; SOWERS; TYAGI, 2005). O balanço entre MMPs e os seus inibidores teciduais (TIMPs) é conhecido por ter um papel central no remodelamento vascular (NAGASE; WOESSNER, 1999). Quatro diferentes TIMPs (TIMP-1, 2, 3 e 4) já foram identificadas em vertebrados (VINCENTI, 2001) e as suas expressões são controladas durante desenvolvimento e remodelamento tecidual. O desbalanço entre MMPs e TIMPs pode levar a um acúmulo ou degradação de MEC (BRASSARD; AMIRI; SCHIFFRIN, 2005). A nefropatia e a vasculopatia em pacientes diabéticos, por exemplo, envolvem excessiva deposição de MEC secundária a uma diminuição da razão MMP/TIMP (KENICHI et al., 2004; WANG; KOKA; LAN, 2005). Expressão aumentada de MMP-2 foi demonstrada em artérias expostas ao aumento do estresse de cisalhamento, indicando que a atividade das MMPs é essencial para a completa resposta de remodelamento que leva a expansão externa do lúmen (HAAS et al., 2007).

Evidências de metabolismo anormal da MEC na hipertensão têm sido publicadas nos últimos anos. Além da diminuição da atividade/ expressão de MMPs tecidual e plasmática, existe redução da atividade do TIMP-1 em pacientes hipertensos, o que pode levar ao acúmulo de produtos de degradação da fibrina imaturos e instáveis, dificultando a deposição de colágeno (ONAL et al., 2009). No entanto, a atividade da elastase sérica, como a MMP-9 e a MMP-2, está aumentada em pacientes com hipertensão sistólica isolada, e os níveis de MMP-9 foram correlacionados com a rigidez aórtica (YASMIN et al., 2005). Curiosamente, o aumento da expressão ou atividade de MMP foi demonstrado em diferentes modelos de hipertensão (CASTRO et al., 2008; SPIERS et al., 2005; WATTS et al., 2007). Essa aparente discrepância entre os estudos poderia ser explicada pelo fato de que a síntese e a degradação da MEC evoluem com o tempo de hipertensão; como citado anteriormente as MMPs são induzidas dentro de alguns dias após o início das condições hipertensivas (FLAMANT et al., 2007). A atividade das metaloproteinases pode anunciar o início do *turnover* de proteína da matriz que eventualmente resulta em rigidez dos vasos.

O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) é uma citocina proteolítica multifuncional que aciona sinais químicos reguladores de várias atividades celulares, incluindo crescimento, divisão (proliferação) (STOUFFER; OWENS, 1994), e diferenciação celular e apoptose (MORIKAWA; DERYNCK; MIYAZONO, 2016; WOLF; RASMUSSEN; RUOSLAHTI, 1994), além de ser um potente indutor da formação da matriz (EPSTEIN; BORDER; NOBLE, 1994). O TGF- β pode ser produzido por múltiplas linhagens de leucócitos e células estromais. Seus membros compreendem os TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 e ainda, BMP (proteína morfogenética óssea), inibinas e ativinas (MASSAGUÉ; PANDIELLA, 1993). Em mamíferos, as três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) são produzidas como precursores latentes, usualmente secretados como um complexo ligado à TGF- β *binding protein* que extracelularmente sofre clivagem proteolítica (ROBERTS, 1998).

A proteína TGF- β é encontrada em todo o corpo, mas é particularmente abundante nos tecidos que compõem o esqueleto, onde ajuda a regular a formação e o crescimento de ossos e cartilagens (FUJIO et al., 2016). O TGF- β também está envolvido na formação de vasos sanguíneos (GOUMANS; LIU; DIJKE, 2009), desenvolvimento de tecido muscular e gordura corporal (FOURNIER et al., 2012), cicatrização de feridas, processos inflamatórios (MAREK et al., 2002; PENN; GROBBELAAR; ROLFE, 2012) e prevenção do crescimento de tumores (JAKOWLEW, 2006). Esta citocina é um possível elemento envolvido no aumento da deposição de colágeno na hipertensão e no diabetes (DIEZ, 2002; SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004; ZIYADEH et al., 1994) através da estimulação da síntese de MEC (CHEN et al., 2000) e redução de sua degradação (EDWARDS et al., 1987; LAVIADES et al., 1998). O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) está também cronicamente elevado em tecido adiposo na obesidade, e contribui para a resistência à insulina e hiperinsulinemia e para o aumento de TGF- β nessas condições. O TNF- α , a insulina e o TGF- β podem levar ao aumento do PAI-1 e consequentemente promover risco cardiovascular. Este agente pró-fibrótico está aumentado no diabetes, em condições que cursam com resistência à insulina e na hipertensão arterial (MCFARLANE; KUMAR; SOWERS, 2003). Os mecanismos da MEC que levam ao aumento do PAI-1 estão envolvidos com o aumento da síntese de colágeno junto com redução da degradação através da *upregulation* de inibidores das proteases da matriz como o PAI-1 (EPSTEIN; BORDER; NOBLE, 1994).

O remodelamento vascular também pode envolver alteração de moléculas de adesão que medeiam a ancoragem de células do músculo liso a componentes da MEC e seus ligantes. A expressão de integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$ está aumentada nas artérias de resistência de SHR (BÉZIE et al., 1999; INTENGAN et al., 1999b; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001). Alterações das glicoproteínas da matriz também foram encontradas. Por exemplo, a fibronectina está aumentada em artérias de SHR (BÉZIE et al., 1998; BOUMAZA et al., 2001) e outras glicoproteínas, como tenascina-C e osteopontina - normalmente não expressas em tecidos adultos - estão reguladas positivamente. Essas alterações, que podem ser induzidas por fatores como a ANG II e o TGF- β (deBLOIS et al., 1996; GIACHELLI et al., 1993; MACKIE et al., 1992), modificam a estrutura vascular aumentando o sítio de ligação célula-MEC e sua localização topográfica. Isso, por sua vez, altera a transdução de informações para a maquinaria intracelular que controla o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência das células.

Na última década o Laboratório de Reatividade Vascular da UFPE têm se dedicado ao estudo dos efeitos da hiperglicemia materna durante a vida intrauterina sobre a função vascular da prole adulta. Os resultados destes estudos demonstram que a prole de ratos fêmeas diabéticas desenvolve alterações metabólicas e vasculares na vida adulta que contribuem para o desenvolvimento de hipertensão arterial (DE QUEIROZ et al., 2015; PORTO et al., 2010; RAMOS-ALVES et al., 2012a, 2012b). A respeito dos danos causados pela hiperglicemia materna sobre a função vascular da prole, Holemans et al. (1999) foram uns dos pioneiros a demonstrar que ratos adultos oriundos de ratos fêmeas diabéticas apresentavam prejuízo da função endotelial em AMR. Da mesma forma, Rocha et al. (2005) relataram um prejuízo da função endotelial em artérias mesentéricas de ratos adultos provenientes de ratos fêmeas com diabetes e sugeriram que esta alteração estava relacionada ao desenvolvimento de hipertensão arterial nestes animais. Mais recentemente, o nosso grupo de pesquisa ao estudar ratos adultos provenientes de mães diabéticas demonstraram que o prejuízo da função endotelial nestes animais era decorrente de mecanismos inflamatórios da parede arterial, secundários à expressão aumentada da ciclooxigenase-2 (COX-2) (RAMOS-ALVES et al., 2012a,

2012b). A expressão desta enzima na parede arterial destes animais resultou em aumento da produção de prostanoides vasoconstritores, como o tromboxano A_2 (TxA_2), a prostaglandina E_2 (PGE_2) e a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), os quais foram responsáveis pelo prejuízo da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e pelo aumento da resposta contrátil à noradrenalina (RAMOS-ALVES et al., 2012a, 2012b). Estas alterações foram revertidas pelo tratamento com losartan, incluindo o aumento da pressão arterial, o que indica a participação do sistema renina-angiotensina nestes processos (DE QUEIROZ et al., 2017). Portanto, considerando tudo que foi mencionado acima, é plausível hipotetizar que a exposição à hiperglicemia materna possa induzir alterações mecânicas e/ou estruturais da parede arterial na prole adulta, já que esta apresenta pressão arterial elevada e expressão de mecanismos inflamatórios na parede arterial, o qual é sabido contribuir para o remodelamento arterial em várias situações de risco cardiovascular. No presente estudo foram desenvolvidas abordagens experimentais para a elucidação destas possíveis alterações e seus possíveis mecanismos em artérias mesentéricas de resistência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo estão de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo: CEUA 0002/2016).

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Neste estudo, foram utilizados apenas ratos com 3 e 12 meses de idade provenientes de mães diabéticas (O-DR) ou controle (O-CR). Ratas Wistar nulíparas foram mantidas em gaiolas com machos, na proporção de 3:1, para serem acasaladas. A constatação da cópula foi feita a partir da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. O primeiro dia de gestação foi considerado 24h após esta constatação. Após sete dias do início da gestação, o diabetes foi induzido através de uma injeção única de estreptozotocina (50 mg/Kg, i.p.). Animais controle receberam injeção de igual volume de veículo (tampão citrato, 0,01 M, pH 4,5). Nestes animais, avaliou-se a glicemia 48h após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato, para a confirmação ou não da indução do diabetes. Apenas ratas com glicemia acima de 200 mg/dL foram utilizadas. Durante a fase de aleitamento, a ninhada foi limitada a 6 (seis) animais por matriz.

3.2 GLICEMIA E PESO CORPORAL DA PROLE

No dia da realização do experimento, a glicemia foi avaliada a partir da coleta de sangue da veia caudal, usando tiras de teste e leitor (ACCU-CHEK®, Roche Diagnostics). Ademais, o peso corporal da prole foi acompanhado semanalmente, do nascimento até o dia do experimento.

3.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (64,9 e 3,2 mg/kg, respectivamente, i.p.). Na sequência, a artéria femoral foi canulada com cateter de polietileno (PE-50), preenchido com salina heparinizada, para medida direta da pressão arterial. Após 24h, as pressão sistólica, diastólica e média foram medidas com os animais acordados através de um transdutor de pressão (modelo MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) conectado a um sistema de aquisição de dados (LabChat v7, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália). A frequência cardíaca foi determinada a partir do pulso de pressão arterial.

3.4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA O ESTUDO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO

Para esse estudo, o leito mesentérico foi removido e colocado em uma placa de Petri contendo solução de *Krebs-Henseleit* (Composição em mM: 115 NaCl, 2,5 CaCl₂, 4,6 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2, MgSO₄.7H₂O, 25 NaHCO₃, 11,1g de glicose e 0,03 EDTA) a 4° C e o terceiro ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e limpo de tecido de adiposo.

3.4.1 Miógrafo de pressão

Através da técnica de artérias pressurizadas, foram analisadas as propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de terceira ordem, de acordo com o método descrito por Halpern et al., (1978). Sucintamente, segmentos arteriais de aproximadamente 2 mm de comprimento foram montados em um miógrafo de pressão (Danish Myo Tech, Modelo 115FP, J.P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). As duas extremidades do segmento arterial foram canuladas e fixadas (com fio de sutura de nylon) a micropipetas de vidro. Em seguida, o comprimento da artéria foi ajustado através do aumento da pressão intravascular até aproximadamente 140 mmHg, de maneira que as paredes arteriais ficassem paralelas e sem estiramento (Figura 4). Com esse procedimento, tornou-se possível verificar também se a artéria estava adequadamente pressurizada. Após ajuste de pressão para 60 mmHg, sob este valor de pressão, aguardou-se um período de

estabilização de 60 minutos, em solução de *Krebs-Henseleit*, gaseificada com mistura carbogênica e mantida a temperatura de 37° C.

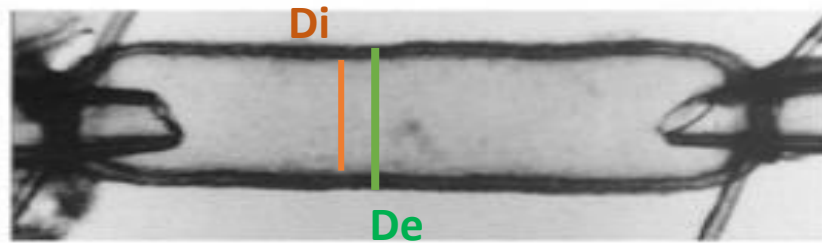


Figura 4. Foto representativa de uma artéria mesentérica de resistência (terceiro ramo da artéria mesentérica superior) pressurizada a 70 mmHg.

Após o período de estabilização, a pressão intravascular foi reduzida a 5 mmHg e uma curva de pressão foi construída, aumentando a pressão intravascular de 5 a 140 mmHg, em aumentos de 20 mmHg e intervalos de 5 minutos. Utilizou-se para este experimento a solução de *Krebs-Henseleit* na presença e na ausência de cálcio (Ca^{2+}). A solução de *Krebs-Henseleit* sem cálcio foi preparada sem o CaCl_2 e com a adição de EGTA 10 mM. Para cada valor de pressão intravascular, ao final dos 5 minutos, o diâmetro interno (D_i) e externo (D_e) foram medidos. Ao final de cada experimento, reduziu-se a pressão intravascular a 70 mmHg em solução sem Ca^{2+} e, assim, fixou-se a artéria em solução de paraformaldeído 4% (PFA, em 0,2 M de tampão fosfato, pH=7,4) a 37° C durante 60 min. As artérias foram mantidas em solução de PFA 4% e guardadas na geladeira até a realização dos estudos de microscopia confocal.

3.4.1.1 Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de resistência

As medidas de diâmetro interno e externo (D_i e D_e) utilizadas para o cálculo dos parâmetros estruturais e mecânicos arteriais foram realizadas em condições passivas (em solução de Krebs sem Ca^{2+} , 0_{Ca}). Os seguintes parâmetros estruturais e mecânicos foram calculados:

1. Espessura de parede (EP)

$$EP = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{2}$$

2. Área de Secção Transversal (AST)

$$AST = \frac{\pi}{4} \times (D_{e0Ca} - D_{i0Ca})$$

3. Relação Parede/ Lúmen (P/ L)

$$P/L = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{(2 \times D_{i0Ca})}$$

De acordo com o método inicialmente descrito por Baumbach & Heistad (1989), calculou-se as propriedades mecânicas das artérias:

4. *Strain* (ϵ). Representa a variação nas dimensões da artéria (deformação, ϵ) em consequência de uma dada tensão aplicada.

$$\epsilon = \frac{(D_{i0Ca} - D_{00Ca})}{D_{00Ca}}$$

Onde: D_{00Ca} é o diâmetro a 3 mmHg e D_{i0Ca} é o diâmetro interno observado para um dado valor de pressão intravascular sob condições de completo relaxamento. O valor de D_{00Ca} foi medido a 3 mmHg, porque é difícil determinar o diâmetro interno a valores inferiores de pressão intravascular.

5. *Stress* de parede (σ) – Tensão (medida por unidade de área) produzida na parede arterial frente a alterações da pressão intravascular, do diâmetro interno e da espessura da parede.

$$\sigma = \frac{(P \times D_{i0Ca})}{(2 \times EP)}$$

Onde: P é a pressão intraluminal (1 mmHg = 133,4 N/m²) e EP é a espessura da parede arterial para cada valor de pressão intravascular em solução de Krebs sem Ca²⁺.

6. A rigidez arterial independente da geometria é determinada pelo módulo elástico de Young (1807), o qual pode ser expresso pela relação entre tensão e deformação ($E = \text{Stress} / \text{Strain}$). No caso de vasos sanguíneos esta relação *stress-strain* exibe um comportamento curvilíneo. Assim, torna-se mais apropriado o cálculo da relação tangencial ou *incremental elastic modulus* (E_{Inc}), o qual pode ser determinado pela inclinação (β) da curva *stress-strain* (DOBRIN, 1978).

$$E_{Inc} = \delta\sigma / \delta\varepsilon$$

O E_{Inc} foi calculado plotando os dados obtidos de *stress* e de *strain* para cada experimento utilizando a equação exponencial abaixo (SigmaPlot, SPSS Inc):

$$\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\varepsilon}$$

Onde: σ_{orig} representa o *stress* de parede para o valor inicial de diâmetro (diâmetro a 3 mmHg). De acordo com a derivação das equações acima é possível obter-se que $E_{Inc} = \beta\sigma$. Para um dado valor de σ , E_{Inc} é diretamente proporcional a β . Um aumento de β implica um aumento de E_{Inc} , o qual representa um aumento da rigidez (DOBRIN, 1978).

7. Distensibilidade

$$D = \frac{AST}{A_{i0Ca}}$$

Onde: A_{i0Ca} é a área de secção transversal interna sob condições de completo relaxamento.

8. Complacência

$$C = \frac{(\Delta D A_{i0Ca})}{(\Delta P)}$$

Onde: $\Delta D A_{i0Ca}$ é a variação da área de secção transversal interna induzida por uma dada mudança de pressão intravascular (ΔP) sob condições de completo relaxamento.

9. Tônus miogênico – representa a contração induzida pelo aumento da pressão intravascular em condições ativas (na presença de Ca^{2+}).

$$Contração = \frac{(D_{i0Ca} - D_{iCa})}{D_{i0Ca}} \times 100$$

3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL

3.5.1 Estudo do conteúdo e organização da elastina

A elastina possui propriedades de autofluorescência. Quando excitada a 488nm, emite fluorescência que pode ser detectada a um comprimento de onda de 500-560nm (BOUMAZA et al., 2001; WONG; LANGILLE, 1996). A artéria foi visualizada através de um microscópio multiespectral confocal (FV1000, Olympus).

Secções ópticas seriadas da camada adventícia ao lúmen do vaso (z step = 0,5 μ m) foram capturadas com uma objetiva de imersão em óleo (NA 1,3), aumento de 63x usando um comprimento de onda de 488nm. Um mínimo de duas séries de imagens de diferentes regiões da artéria foi capturado em cada segmento arterial analisado. Todas as imagens foram capturadas sob as mesmas condições de

intensidade do laser, brilho e contraste. Uma análise quantitativa da intensidade de fluorescência (média da intensidade de fluorescência por pixel) e tamanho das fenestras da lâmina elástica interna foi realizada com o programa Image J. Para isso, reconstruiu-se tridimensionalmente a LEI (Figura 5). Para cada série de imagens obtida, realizou-se um mínimo de cinco medidas para cada um dos parâmetros avaliados. Sabendo-se que a concentração de elastina tem uma relação linear com a intensidade de fluorescência (BLOMFIELD; FARRAR, 1969; BRIONES et al., 2003), assumiu-se que o sinal de fluorescência em uma determinada projeção era diretamente proporcional à concentração de elastina em um dado pixel.

As projeções tridimensionalmente reconstruídas da LEI foram segmentadas e imagens binárias foram obtidas. Nessas imagens, foram medidos o número e o tamanho das fenestras.

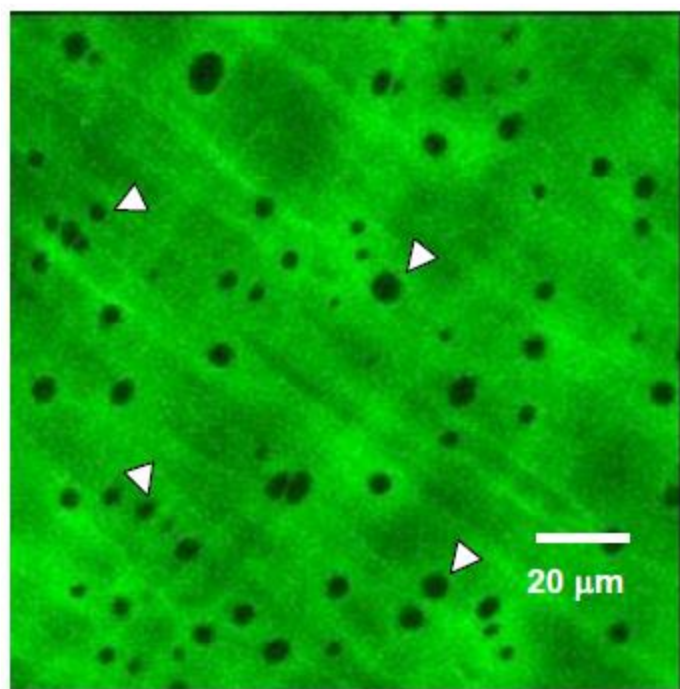


Figura 5. Reconstrução tridimensional das secções ópticas obtidas através de microscopia confocal da lâmina elástica interna (LEI) da parede vascular de artérias mesentéricas de resistência pressurizadas a 70 mmHg e fixadas com paraformaldeído 4%. A imagem mostra a elastina representada em verde e suas diversas fenestrações (setas) (Tese Fabiano Elias Xavier, 2005).

3.6 DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO NA PAREDE ARTERIAL

O conteúdo de colágeno na parede arterial foi determinado de acordo com o método previamente descrito por Izzard et al. (2003). Os terceiros ramos da artéria

mesentérica superior foram dissecados, limpos de tecido adiposo, fixados em PFA 4% e lavados em tampão fosfato (pH 7,4). Após lavagem, os segmentos foram incubados durante 1 hora em tampão fosfato contendo sacarose 30%. Em seguida os segmentos foram colocados em um molde para criostato contendo meio para congelamento (Tissue-Tek OCT, Bayer, Química Farmacéutica; Barcelona, Espanha). As artérias foram congeladas em nitrogênio líquido e foram mantidas congeladas a -70° C até o dia dos experimentos. Os segmentos arteriais congelados foram cortados em secções transversais de 10 µm de espessura, postos em uma lâmina revestida com gelatina (Gelatina 3%; Cromo alumbre de potássio 0,3%) e secos em temperatura ambiente durante 1 hora. Depois da retirada do meio de congelamento com água destilada, o colágeno foi corado sob agitação com *picro sirius* (0,1% em água) (Picro Sirius F3B em solução saturada de ácido pícrico) (Aldrich Chemical Company, Inc., Espanha). As imagens foram captadas através de um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TE 2000-S, objetiva de 40x) usando uma câmera digital (Nikon DXM 1200F). A análise da área total da parede vascular e daquela ocupada pelo colágeno foi realizada com o uso do software Image-Pro Plus 6.0 para análise de imagens. A determinação da quantidade de colágeno na parede vascular foi expressa pela relação entre área ocupada pelo colágeno e a área total da parede arterial.

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA DO COLÁGENO TIPO 1

Através de imunofluorescência, determinou-se a expressão do colágeno tipo 1 em cortes transversais de segmentos da artéria mesentérica de resistência (AMR) da prole proveniente de ratas controle e diabética. Para isso as AMR foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA em 0,2 M PBS, pH: 7,2-7,4) durante aproximadamente 2 horas. Após este período, as artérias foram lavadas três vezes durante 10 minutos com PBS 0,1 M. Após isso, os segmentos foram incubados com Sacarose 30% durante 1 hora; na sequência foram incluídos em meio de congelamento "OCT Tissue-Tek" (Sakura Finetek Europe, Holanda), congelados em nitrogênio líquido e guardados a -80° C. No dia das análises, foram realizados cortes transversais de 10 µm de espessura com um criostato sobre lâminas gelatinadas. Após período de secagem a 37° C por 30 minutos, as lâminas foram lavadas com PBS 0,1 M e bloqueadas com PBS 0,1 M, Triton 0,1% e BSA 2% durante 40 minutos

a 37° C para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Após o bloqueio, as artérias foram incubadas com anticorpo anti-colágeno tipo 1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, INC.) durante toda a noite a 4° C. No outro dia, depois de três lavados de 5 minutos com PBS 0,1 M, as artérias foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-mouse IgG (1:500) conjugado com Cy3 (1:500, Jackson Immunoresearch, Ely, UK) durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as artérias foram lavadas durante 5 minutos por 3 vezes com PBS 0,1 M. Para visualizar a presença das três camadas vasculares, os cortes foram corados com corante nuclear Hoechst 33342 (0.01 mg/mL, Sigma Chemical). Os anticorpos foram diluídos com PBS 0,1 M, Triton 0,1% e BSA 0,5% e todas as incubações foram realizadas em câmara úmida.

A fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência Nikon com lente objetivo 40x. O anticorpo conjugado com Cy3 foi visualizado com $\lambda_{exc} = 550$ nm e detectados com $\lambda_{em} = 570$ nm. Os núcleos corados com Hoechst foram visualizados com excitação de 351 e 364 nm e detecção a 400–500 nm. A especificidade da união foi avaliada mediante a omissão do anticorpo primário e o mesmo processamento da amostra.

3.8 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE COMPONENTES DA PAREDE VASCULAR

Através da técnica de *Western blot*, determinou-se a expressão das isoformas das metaloproteinases da matriz (MMP)-2, MMP-9, dos inibidores das metaloproteinases teciduais (TIMP)-1, TIMP-2 e TGF- β 1. Para isso, as artérias mesentéricas de resistência (AMR) foram homogeneizadas em solução tampão isotônica fria contendo 250 mM de sacarose, 10 mM HEPES-tris (pH 7,4), 2 mM de EDTA e 0,15 mg·ml⁻¹ de inibidor de tripsina (tipo II-S) suplementado com 1 mM PMSF. Os homogenatos foram centrifugados a 500x g por 10 minutos e a concentração de proteína no sobrenadante foi medida pelo método de Bradford (1976).

Alíquotas do homogenato proteico (30 μ g de proteína) e do padrão de peso molecular foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed, previamente

imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 3 horas (Power Pac™ HC, BioRad, Singapura). Após o término da eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (GE Healthcare®, Brasil Ltda) por 40 minutos. Ao final da transferência, incubou-se as membranas por 2 horas à temperatura ambiente, com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite a 4° C, sob agitação, em solução de albumina 5% em tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) com os anticorpos primários para MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TGF- β 1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ou β -actina (1:500, Sigma; St. Louis, MO, E.U.A.). Após quatro lavagens com tampão Tris, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (GE Healthcare do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). As bandas correspondentes foram detectadas por uma reação de quimiluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). Os imunocomplexos foram detectados por um sistema foto-documentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.). A análise densitométrica das bandas foi realizada com o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.). Os dados de conteúdo das proteínas de interesse nos homogenatos de AMR foram expressos como a razão entre os sinais correspondentes da proteína estudada em relação à banda identificada para a β -actina.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos resultados foi realizada através de teste *t* de *student* pareados e análise de variância (ANOVA, uma ou duas vias), completamente randomizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, com auxílio do programa GraphPad Prism (San Diego, CA, E.U.A.). Os resultados foram considerados com significância estatística para valores $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

As ratas que receberam injeção única de STZ apresentaram hiperglicemia severa entre os dias 14 e 21 da gestação quando comparadas às controle (controle: $85 \pm 2,4$ vs. diabéticas $480 \pm 2,3$ mg/dL, test t: $P < 0,05$). As ratas diabéticas deram à luz menos filhotes do que as ratas controles (controle: 10 ± 1 vs. diabéticas 6 ± 2 filhotes por ninhada; teste t: $P < 0,05$).

4.1 GLICEMIA E PESO CORPORAL DA PROLE

O peso corporal ao nascimento foi significativamente menor na prole de ratas diabéticas (O-DR) em comparação à prole de ratas controle (O-CR) (O-CR: 7.65 ± 0.87 vs. 5.91 ± 0.91 g, test t: $P < 0,05$). Além disso, o peso corporal médio foi significativamente menor em animais O-DR adultos com 3 e 12 meses de idade quando comparado com seu respectivo controle (Tabela 1). Os níveis de glicose no sangue foram semelhantes entre os grupos O-CR e O-DR (Tabela 1).

4.2 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Apesar de aos 3 meses de idade a pressão arterial média do grupo O-DR não ter sido diferente do grupo O-CR (Tabela 1), aos 12 meses de idade, esta apresentou-se significativamente mais elevada no grupo O-DR em comparação ao grupo O-CR (Tabela 1). A frequência cardíaca foi similar em todos os grupos estudados (resultados não mostrados).

Tabela 1. Peso corporal, glicose sanguínea em jejum e pressão arterial média de ratos O-CR e O-DR com 3 e 12 meses (M) de idade.

	O-CR 3M	O-DR 3M	O-CR 12M	O-DR 12M
Peso corporal (g)	318 ± 7,0	295 ± 9,0*	467 ± 0,4	440 ± 3,0*
Glicose sanguínea em jejum (mg·dL⁻¹)	95 ± 3,4	99 ± 1,3	94 ± 4,0	91 ± 2,0
Pressão arterial média (mmHg)	98 ± 3,0	104 ± 8,0	102 ± 5,0	149 ± 4,0*

*Os resultados estão expressos como média ± SEM. ANOVA: *P<0,05 comparado com O-CR de mesma idade.*

4.3 PROPRIEDADES MIOGÊNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO

A Figura 6 mostra a relação pressão:diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) da prole proveniente de ratas controle (O-CR) (Figura 6A e 6B) e diabéticas (O-DR) (Figura 6C e 6D) com 3 meses de idade, em condições ativas (na presença de 2,5 mM de Ca^{2+}) e passivas (ausência de Ca^{2+} no meio). Como é possível observar, nas AMR de ambos os grupos, tanto na presença como na ausência de Ca^{2+} , o aumento da pressão intravascular induziu um aumento progressivo dos diâmetros externo e interno das artérias de ambos os grupos. No grupo O-CR, essa resposta foi similar em ambas as situações experimentais, ou seja, na presença e na ausência de Ca^{2+} (Figura 6A e 6B). Contudo, no grupo O-DR, os diâmetros externo e interno, em condições ativas, apresentaram-se significativamente reduzidos quando comparado às condições passivas (Figura 6C e 6D), sugerindo a presença de resposta miogênica. Estes dados estão bem evidenciados na Figura 7, que mostra a contração ativa (%) das AMR de ambos os grupos, a qual apresenta-se elevada nos ratos O-DR com 3 meses de idade.

A Figura 8 mostra os parâmetros morfométricos obtidos em AMR pressurizadas de O-CR e O-DR com 3 meses de idade, sob condições passivas (0Ca^{2+}). Para todos os valores de pressão intravascular avaliados, os diâmetros externo (Figura 8A) e interno (Figura 8B), a espessura de parede (Figura 9A), a relação parede/lúmen (Figura 9B) e a área de secção transversal (AST) (Figura 9C) das AMR foram similares em ambos os grupos experimentais ($P>0,05$).

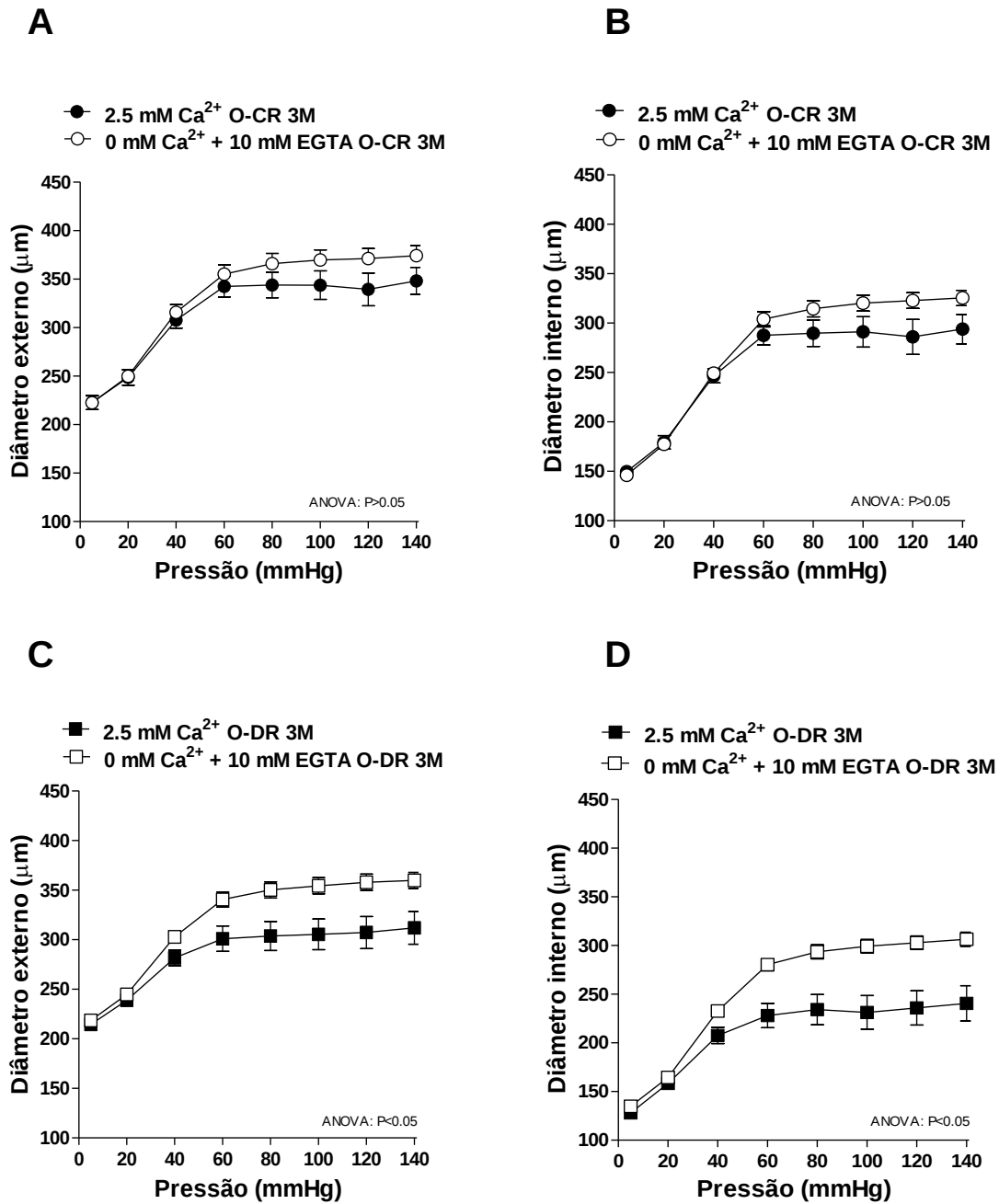


Figura 6. Relação pressão:diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos O-CR (A e B, $n=10$) e O-DR (C e D, $n=12$) com 3 meses de idade em condições ativas e passivas (Cálcio zero, 0Ca^{2+}) (A e C: diâmetro externo; B e D: diâmetro interno). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos valores de diâmetro (μm) externo e interno frente às alterações de pressão intravascular.

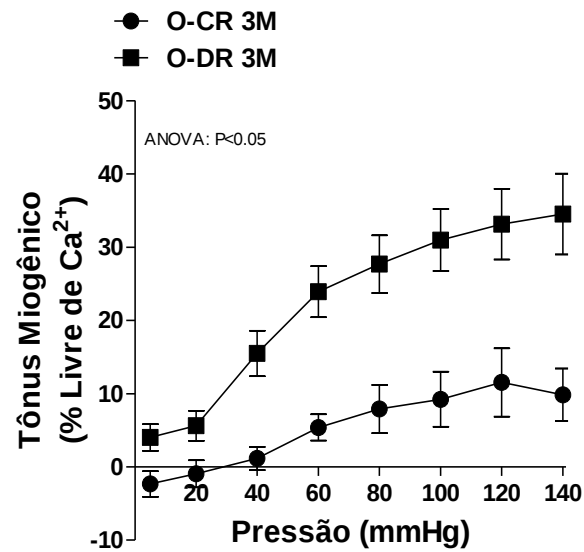
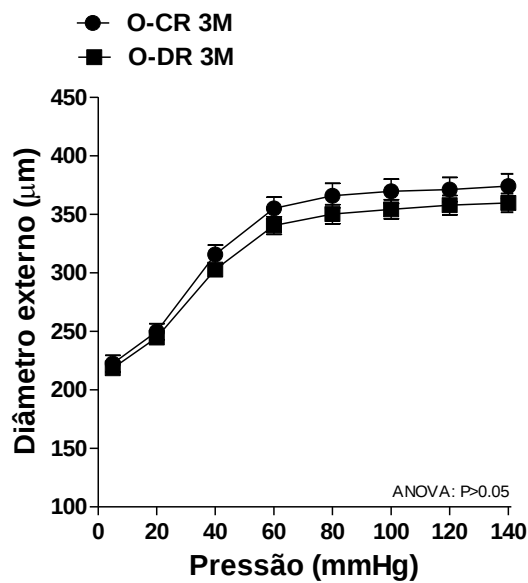


Figura 7. Contração miogênica induzida pela elevação da pressão intraluminal em AMR de ratos O-CR e O-DR com 3 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos valores percentuais da variação de diâmetro interno frente às elevações da pressão intravascular sob condições ativas ($CaCl_2$ 2,5 mM).

A



B

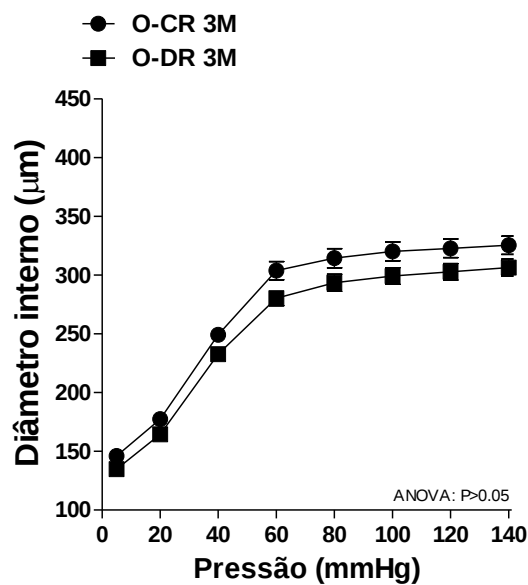


Figura 8. Relação pressão:diâmetro de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n=10$) e O-DR ($n=12$) com 3 meses de idade. (A: diâmetro externo; B: diâmetro interno). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos valores de diâmetro (μm) externo e interno frente às alterações de pressão intravascular.

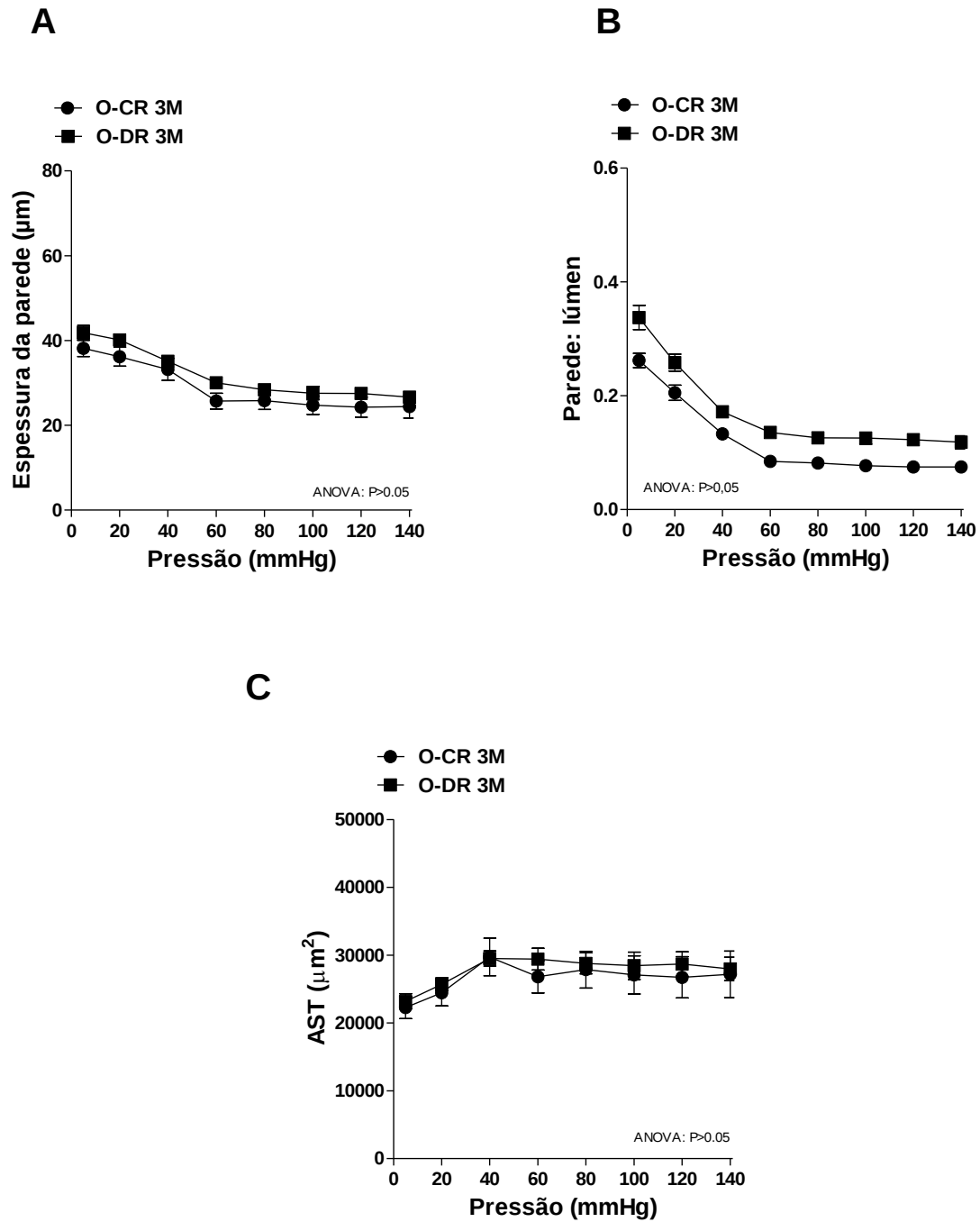


Figura 9. Parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n=10$) e O-DR ($n=12$) com 3 meses de idade. (A) Espessura da parede arterial, (B) relação parede:lúmen e (C) área de secção transversal (AST). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A Figura 10 mostra a relação pressão:diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) dos grupos O-CR (Figura 10A e 10B) e O-DR (Figura 10C e 10D) com 12 meses de idade, em condições ativas (na presença de 2,5 mM de Ca^{2+}) e passivas (ausência de Ca^{2+} no meio). No grupo O-CR, a resposta ao aumento da pressão intravascular foi similar em ambas as situações experimentais (ativa vs. passiva) (Figura 10A e 10B). Contudo, no grupo O-DR, em condições ativas, os diâmetros externo e interno apresentaram-se significativamente reduzidos quando comparados às condições passivas (Figura 10C e 10D), demonstrando presença de tônus miogênico. Estes dados estão em maior destaque na Figura 11A, que mostra o tônus miogênico (expresso pelo percentual do diâmetro interno em solução livre de Ca^{2+}), o qual está significativamente aumentado no grupo O-DR com 12 meses de idade quando comparado com seu respectivo controle. Entretanto, a resposta miogênica do grupo O-DR foi semelhante com 3 e 12 meses de idade (Figura 11B).

Os parâmetros morfométricos das AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses estão representados nas Figuras 12 e 13. Para todos os valores de pressão intravascular avaliados, o diâmetro externo não apresentou diferença entre os grupos (Figura 12A), enquanto o diâmetro interno (Figura 12B) foi reduzido no grupo O-DR. Por outro lado, a espessura de parede (Figura 13A), a relação parede/lúmen (Figura 13B) e a área de secção transversal (AST) (Figura 13C) apresentaram-se significativamente elevados nas artérias do grupo O-DR em comparação ao grupo O-CR.

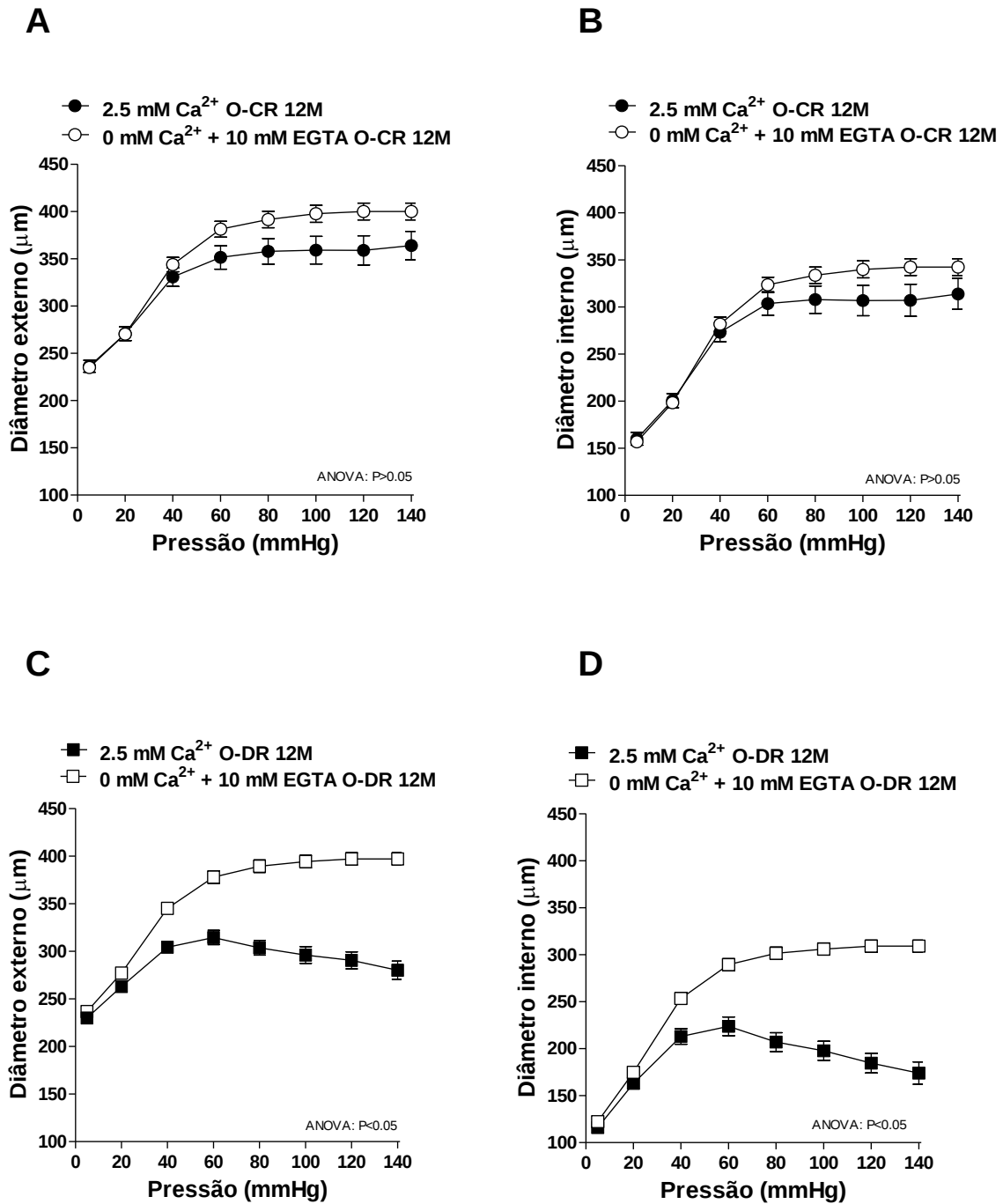


Figura 10. Relação pressão:diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos O-CR (A e B, $n=18$) e O-DR (C e D, $n=20$) com 12 meses de idade em condições ativas e passivas (Cálcio zero, 0Ca^{2+}) (A e C: diâmetro externo; B e D: diâmetro interno). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos valores de diâmetros (μm) externo e interno frente às alterações de pressão intravascular.

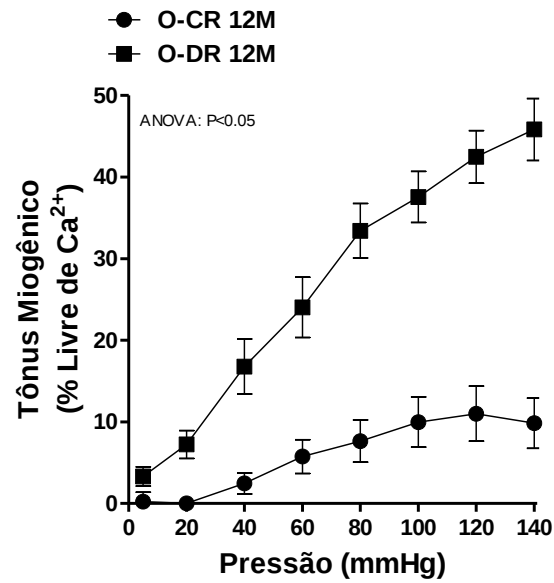
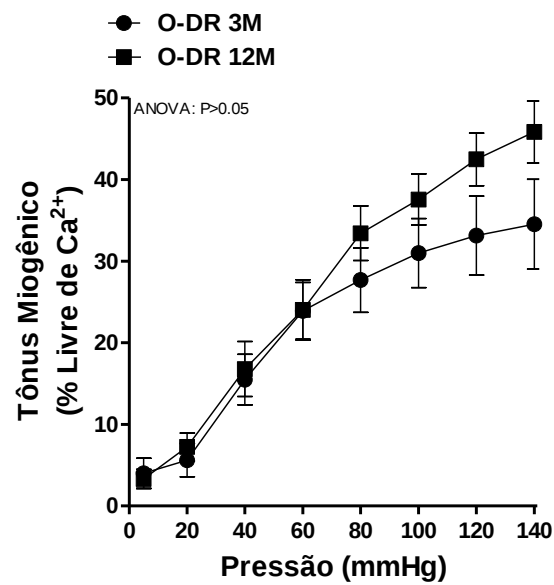
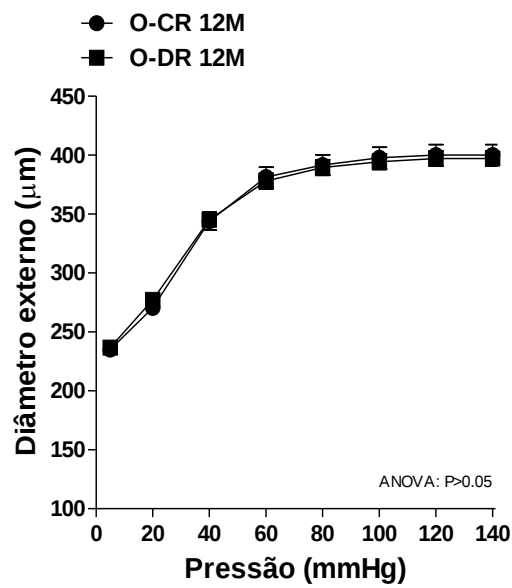
A**B**

Figura 11. (A) Contração miogênica induzida pela elevação da pressão intraluminal em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade e (B) em ratos O-DR com 3 e 12 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos valores percentuais da variação de diâmetro interno frente às elevações da pressão intravascular sob condições ativas ($CaCl_2$ 2,5 mM).

A



B

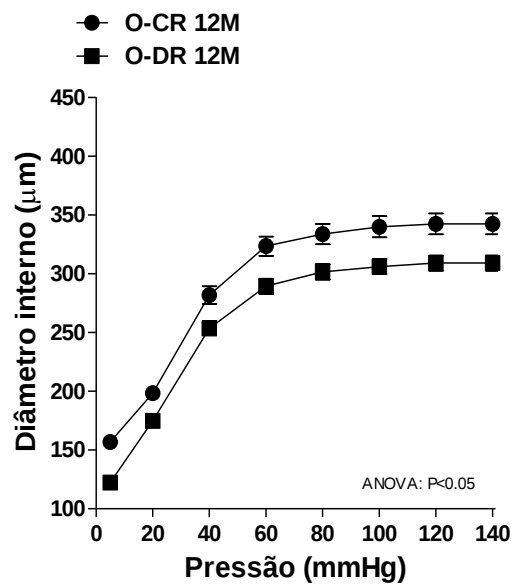


Figura 12. Relação pressão:diâmetro de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n=18$) e O-DR ($n=20$) com 12 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos valores de diâmetro (μm) externo e interno frente às alterações de pressão intravascular.

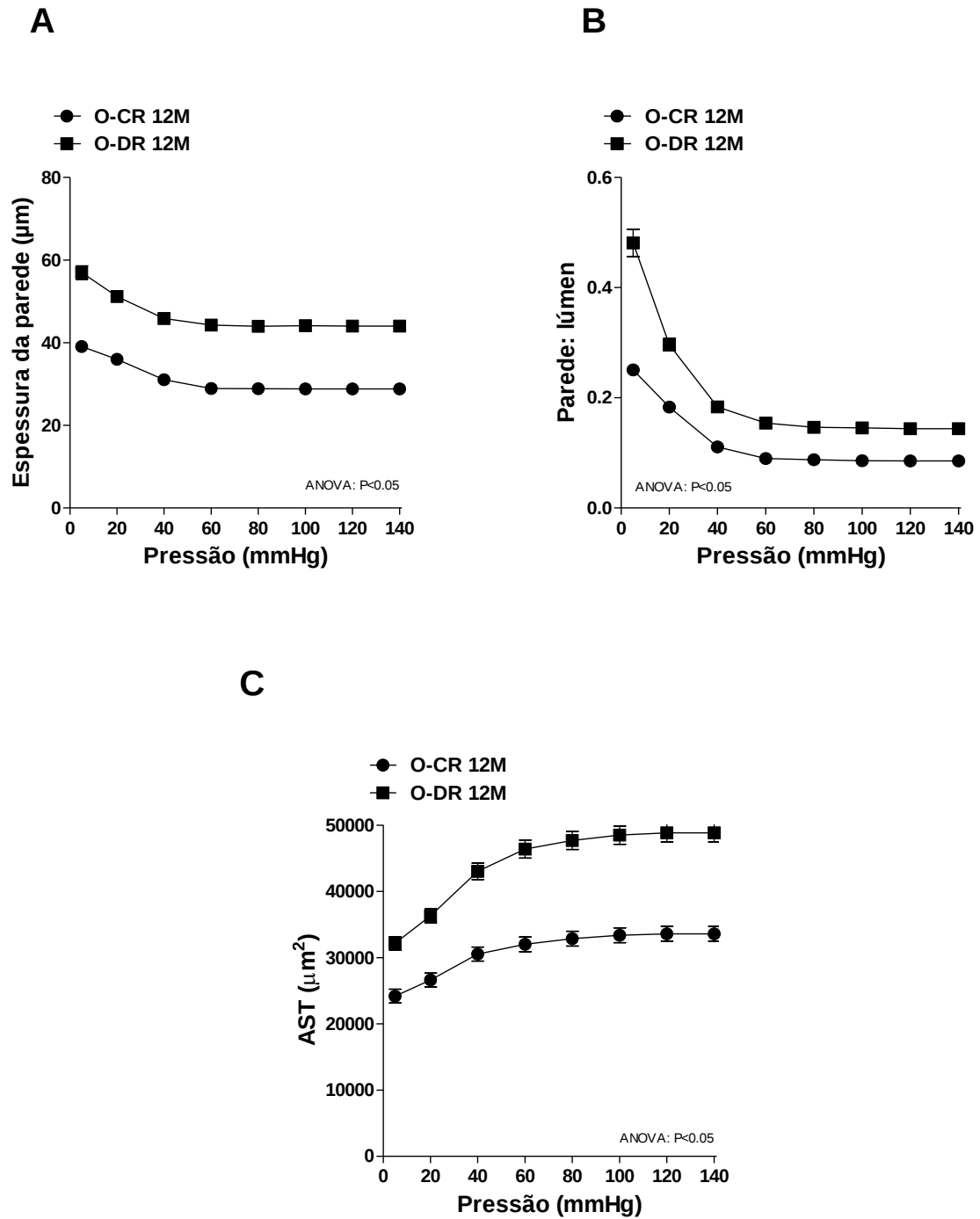


Figura 13. Parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n=18$) e O-DR ($n=20$) com 12 meses de idade. (A) Espessura da parede arterial, (B) relação parede:lúmen e (C) área de secção transversal (AST). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO

As Figuras 14 e 15 mostram as propriedades mecânicas das AMR da prole O-CR e O-DR com 3 meses de idade em condições de máximo relaxamento (0Ca^{2+}). Em ambos os grupos, os parâmetros *stress* de parede (Figura 14A), relação *stress-strain* (Figura 14B), módulo elástico (Figura 14C) e distensibilidade (Figura 15A) e complacência (Figura 15B), foram semelhantes. A similaridade da relação *stress-strain* nestes animais pode ser comprovada pela semelhança entre os valores de β de ambos os grupos (O-CR: $5,75 \pm 0,58$ vs. O-DR: $5,10 \pm 0,31$, $P > 0,05$).

A Figura 16 representa as propriedades mecânicas das AMR da prole O-CR e O-DR com 12 meses de idade. O aumento da pressão intravascular induziu aumento do *stress* de parede, porém este aumento foi menor nas AMR de animais O-DR (Figura 16A). Como mostrado pelo deslocamento para direita da relação *stress-strain* (Figura 16B), pelos menores valores do módulo elástico (Figura 16C) e pelo menor valor de β (Valores médios de β : O-CR: $6,18 \pm 0,59$ vs. O-DR: $4,56 \pm 0,20$, $P < 0,05$), as AMR de ratos O-DR apresentaram uma menor rigidez arterial quando comparadas com seu respectivo controle. Além disso, a distensibilidade (Figura 17A) e a complacência (Figura 17B) das AMR de ratos O-DR 12 meses foram maiores nos valores de pressão intravascular de 20 e 40 mmHg e nos valores de 20, 40 e 60 mmHg, respectivamente.

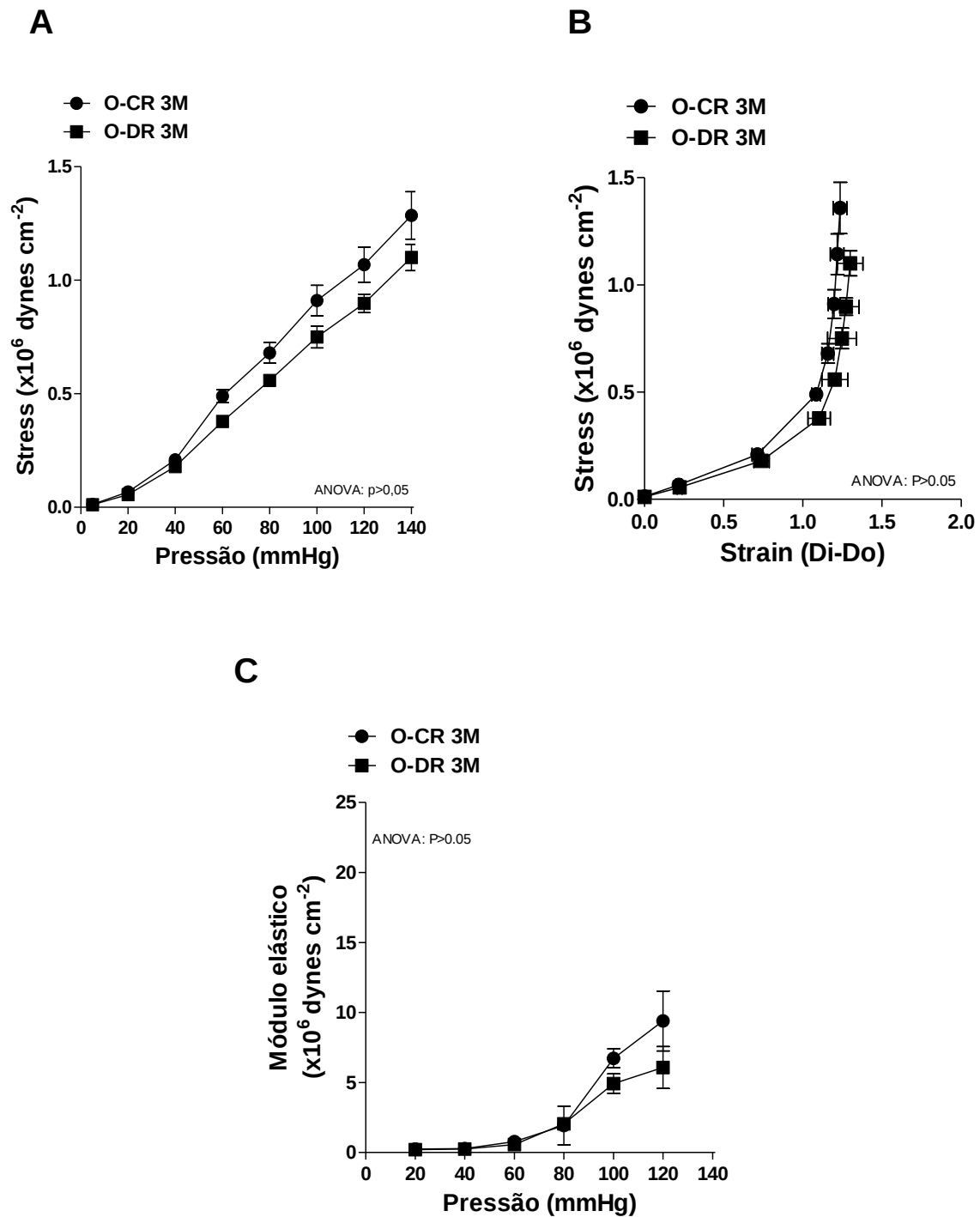
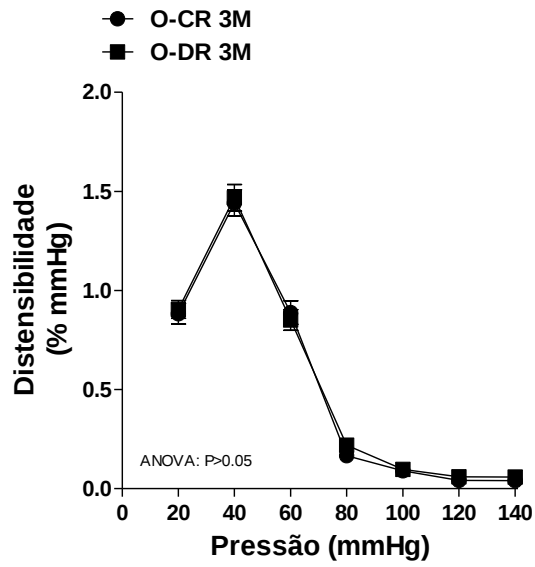


Figura 14. (A) Medidas de *stress* da parede, (B) relação *stress-strain* e (C) módulo elástico induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n = 10$) e O-DR ($n = 12$) com 3 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A



B

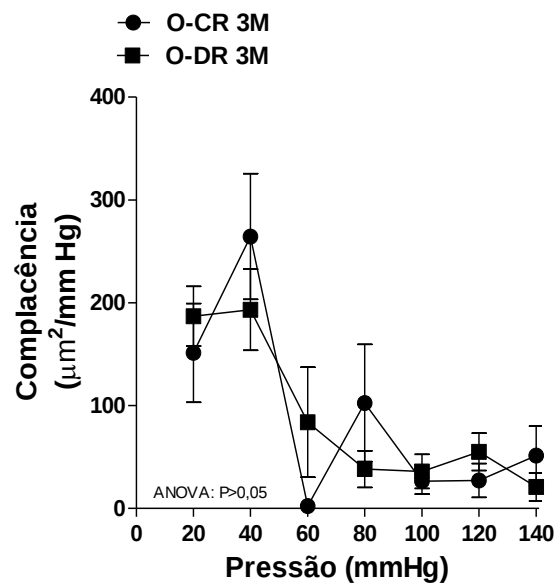


Figura 15. (A) Medidas de distensibilidade e (B) complacência induzidas por mudanças crescentes de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n = 10$) e O-DR ($n = 12$) com 3 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

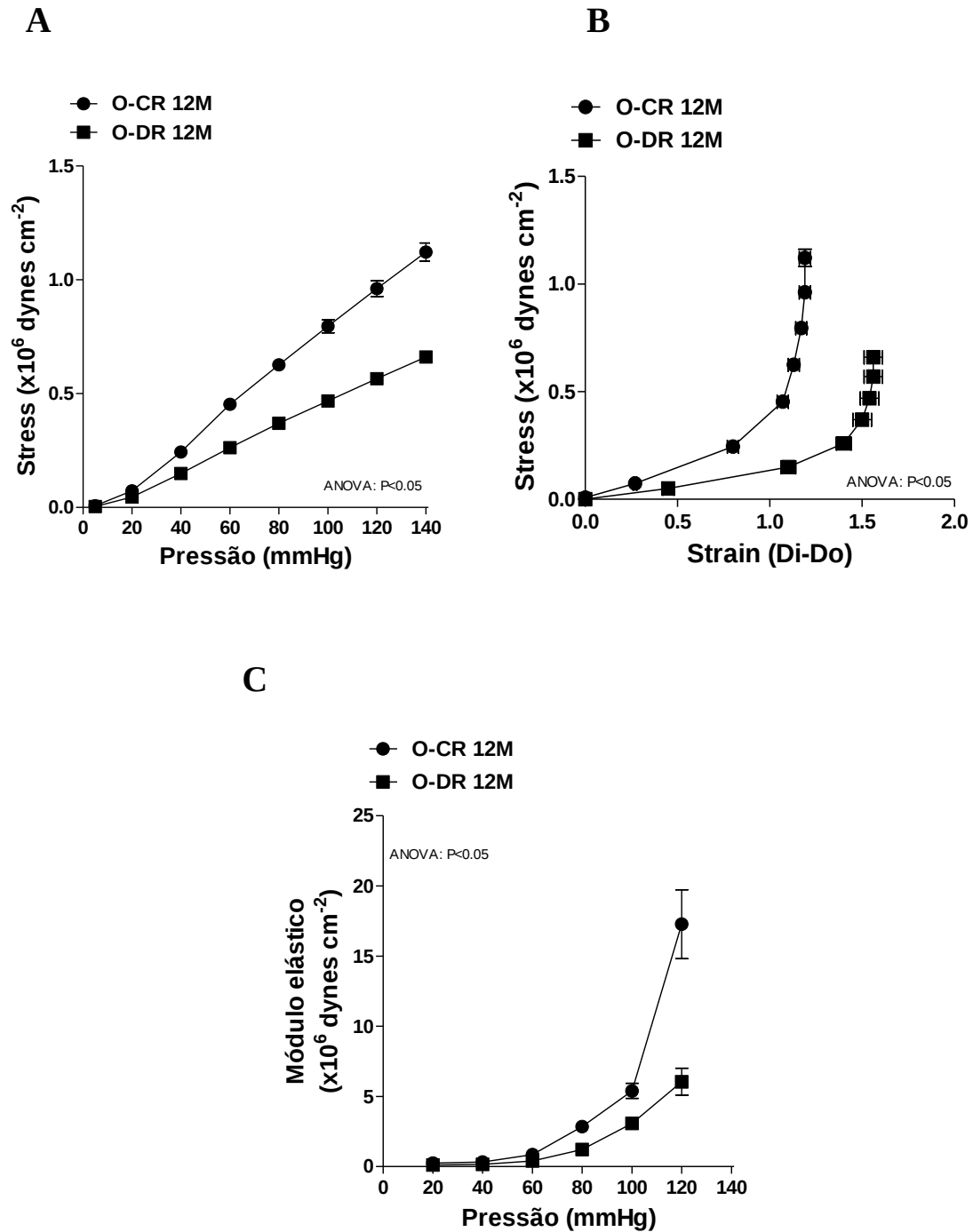
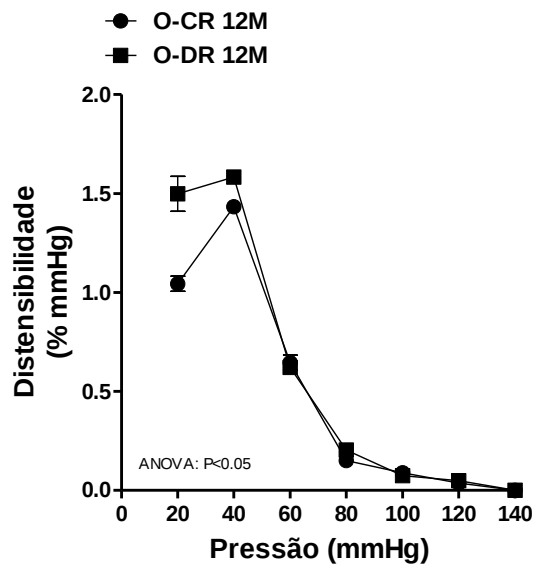


FIGURA 16. (A) Medidas de *stress* da parede, (B) relação *stress-strain* e (C) módulo elástico induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n = 18$) e O-DR ($n = 20$) com 12 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A



B

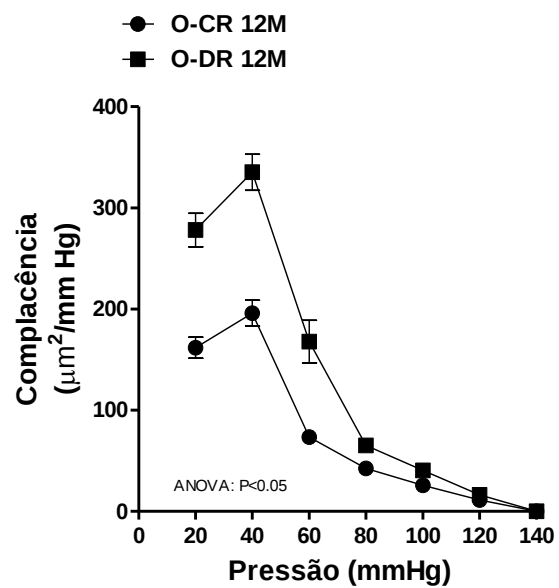


Figura 17. (A) Medidas de distensibilidade e (B) complacência induzidas por mudanças crescentes de pressão intravascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0Ca^{2+}) de ratos O-CR ($n = 18$) e O-DR ($n = 20$) com 12 meses de idade. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.5 CONTEÚDO E ORGANIZAÇÃO DA ELASTINA

Os segmentos de AMR apresentaram autofluorescência na adventícia e lâmina elástica interna (LEI). A LEI nas artérias de ambos os grupos possui uma estrutura claramente organizada de uma rede elástica compacta e fenestrada (Figura 18). O número total de fenestras em animais O-DR com 12 meses foi menor, porém o tamanho médio das fenestras mostrou-se maior mesmo não apresentando significância comparado aos ratos O-CR (Figura 19).

A média da intensidade de fluorescência por pixel mostrou-se reduzida em animais O-DR 12 meses, embora não apresente diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo O-CR (Figura 19).

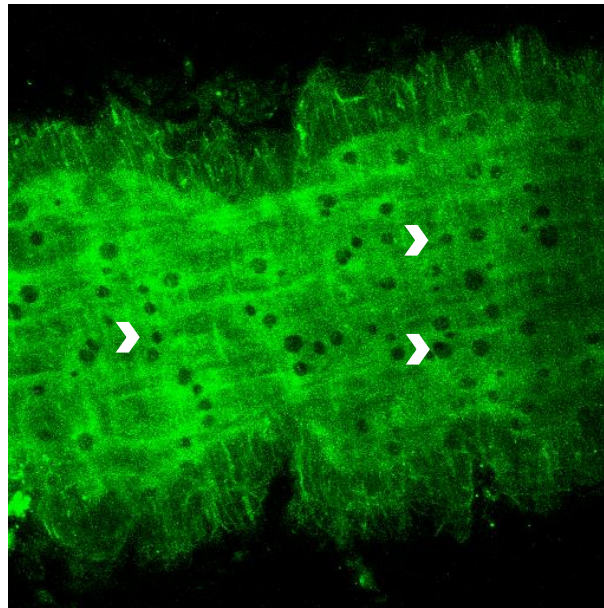
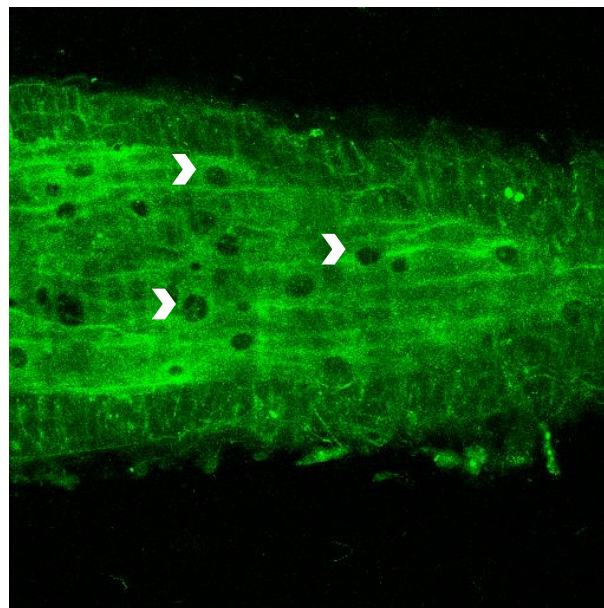
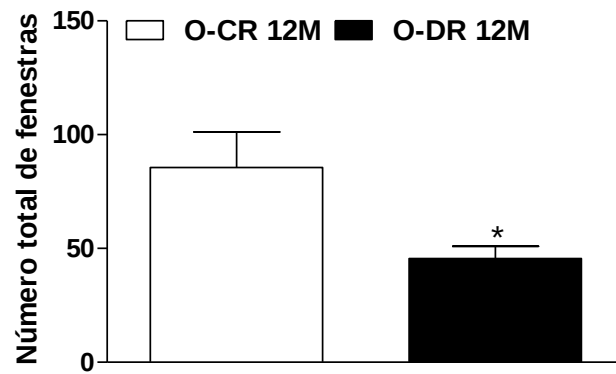
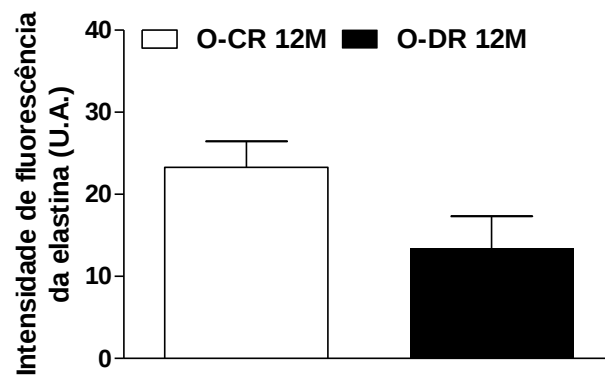
A**B**

Figura 18. Reconstrução tridimensional das secções ópticas obtidas através de microscopia confocal da lâmina elástica interna (LEI) da parede vascular de artérias mesentéricas de resistência de rato pressurizadas a 70 mm Hg e fixadas com paraformaldeído 4 %. A imagem mostra a elastina representada em verde e suas diversas fenestrações (setas). A. O-CR 12 meses, B. O-DR 12 meses. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 63x.

A



B



C

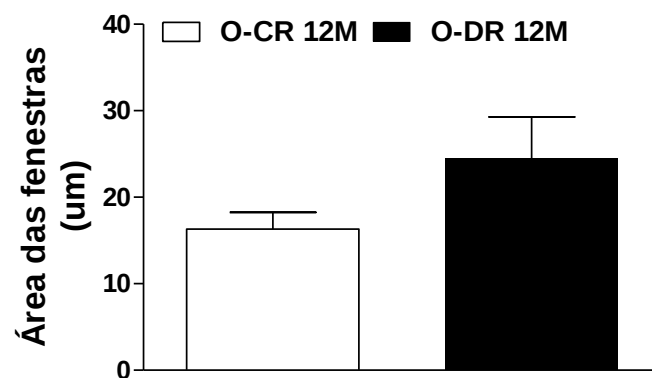


Figura 19. Número das fenestras (A), áreas das fenestras (B) e intensidade de fluorescência da elastina (C) na LEI de AMR dos grupos O-CR e O-DR com 12 meses de idade. Teste t: *P<0,05.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE COLÁGENO

Como demonstrado na Figura 20A-D, em artérias de resistência de ratos, o colágeno total está distribuído principalmente nas camadas adventícia e média. O que pode ainda ser observado é que não houve diferença significativa no acúmulo de colágeno total nas artérias dos animais O-CR e O-DR com 3 e 12 meses de idade (Figura 21).

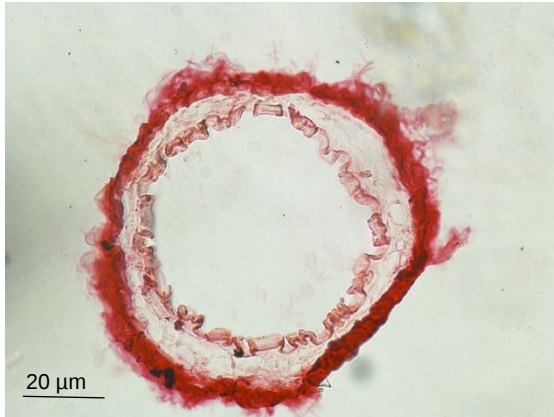
A**O-CR 3M****B****O-CR 12M****C****O-DR 3M****D****O-DR 12M**

Figura 20. (A-D) Imagens representativas do conteúdo total de colágeno marcado com *Picrosirius red* em artérias mesentéricas de resistência de ratos O-CR com 3 meses, O-CR com 12 meses, O-DR com 3 meses e O-DR com 12 meses de idade.

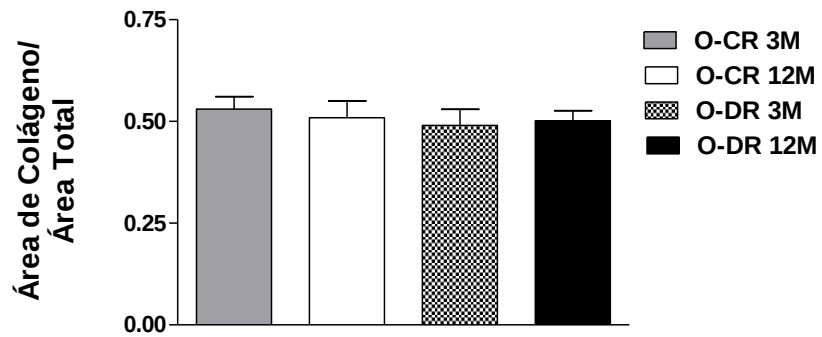


Figura 21. Valores médios da área ocupada pelo colágeno em função da área total da parede vascular de artérias mesentéricas de ratos O-CR com 3 meses, O-CR com 12 meses, O-DR com 3 meses e O-DR com 12 meses de idade. Os resultados estão expressos com média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA 1 via: $p > 0,05$, ($n = 6$ cada grupo).

4.7 EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO 1 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Na análise de cortes transversais de segmentos de AMR, a expressão de colágeno tipo 1 em animais O-DR com 12 meses mostrou uma diminuição da imunomarcação para esta proteína quando comparada aos animais O-CR com 12 meses de idade (Figura 22). Os valores quantitativos estão representados na figura 23.

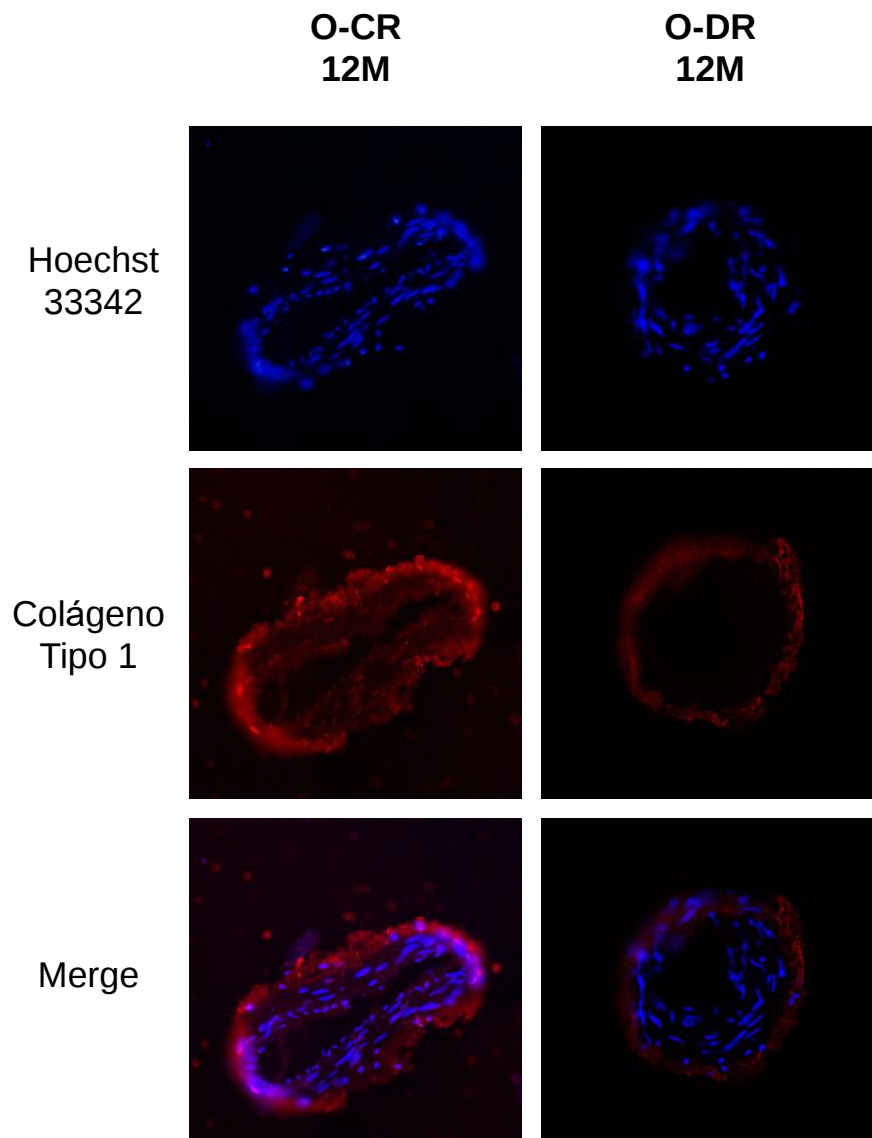


Figura 22. Imagens representativas da imunomarcação do colágeno tipo 1 nas artérias mesentéricas de resistência (AMR) da prole O-CR e O-DR com 12 meses de idade.

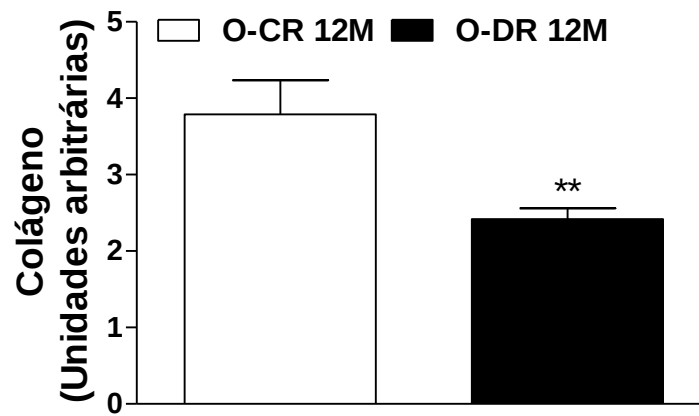


Figura 23. Quantificação da intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias) do colágeno tipo 1 nas artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade (n = 6 cada grupo).

4.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DA MATRIZ EXTRACELULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO

4.8.1 Metaloproteinases da matriz (MMP)-2, MMP-9, inibidores de metaloproteinases tecidual (TIMP)-1, TIMP-2 e fator de crescimento transformador- β (TGF- β)

As Figuras 24 e 25 mostram a expressão das proteínas regulatórias da matriz (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e TGF- β 1) detectada por *Western blot* em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade. Nestas artérias, a exposição intrauterina ao diabetes mellitus materno reduziu significativamente a expressão proteica da MMP-2 na prole O-DR (Figura 24A). Por outro lado, a expressão da MMP-9 foi maior nos ratos O-DR com 12 meses de idade (Figura 24B).

A expressão dos TIMP-1 (Figura 25A) e TIMP-2 (Figura 25B) não foram diferentes nas AMR dos grupos O-CR e O-DR com 12 meses. Entretanto, a expressão do TGF- β 1 (Figura 25C) se mostrou aumentada no grupo O-DR com 12 meses de idade em comparação ao grupo O-CR.

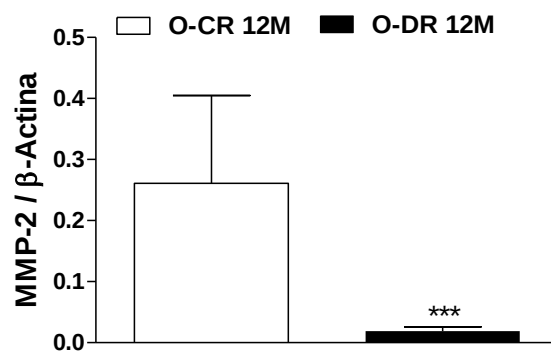
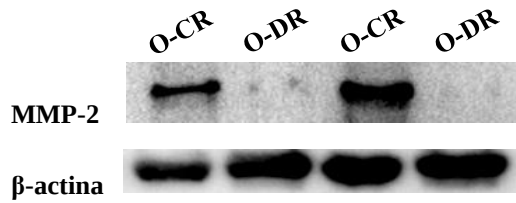
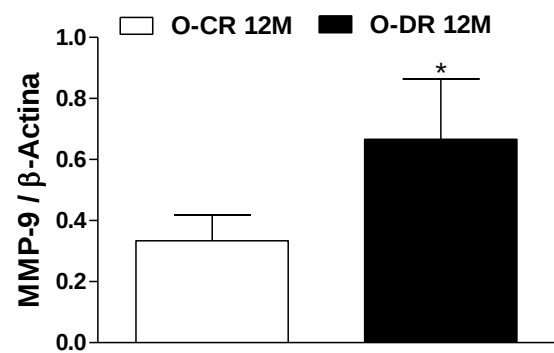
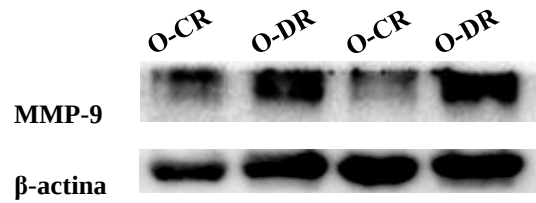
A**B**

Figura 24. Expressão das Metaloproteinases-2 (MMP-2) e MMP-9 em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade. Painel superior mostra as bandas representativas da expressão da MMP-2 (A) e MMP-9 (B). Painel inferior mostra a análise densitométrica da MMP-2 e MMP-9 normalizada pelo conteúdo de β-actina. Os resultados estão como média ± erro padrão. N=4 ratos em cada grupo. Teste t, ***P<0.001, *P<0,05 vs. O-CR.

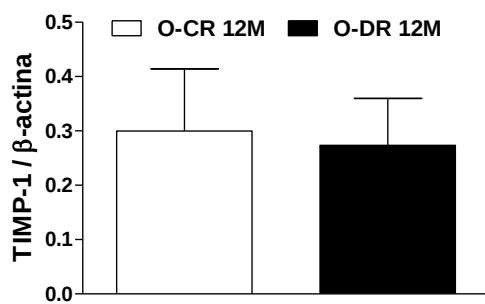
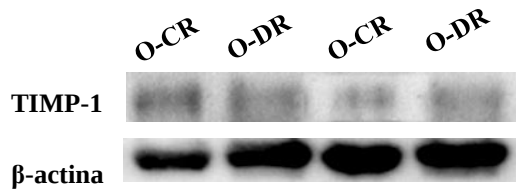
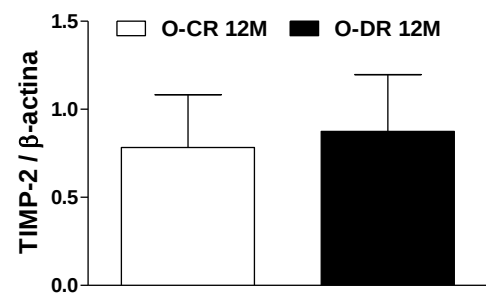
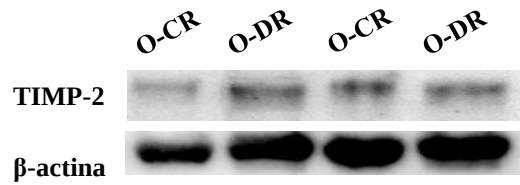
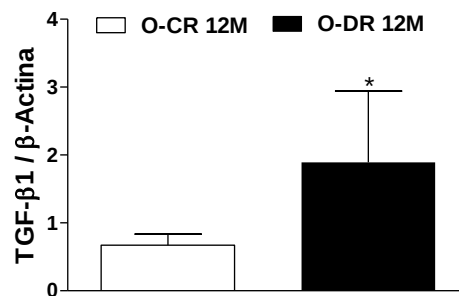
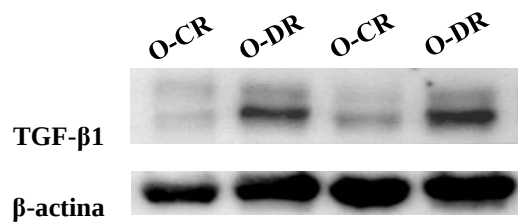
A**B****C**

Figura 25. Expressão dos Inibidores das Metaloproteinases-1 (TIMP-1), TIMP-2 e TGF- β 1 em AMR de ratos O-CR e O-DR com 12 meses de idade. Painel superior mostra as bandas representativas da expressão da TIMP-1 (A), TIMP-2 (B) e de TGF- β 1 (C). Painel inferior mostra a análise densitométrica da TIMP-1, TIMP-2 e TGF- β 1 normalizada pelo conteúdo de β -actina. Os resultados estão como média $\pm$ erro padrão. N=4 ratos em cada grupo. Teste t, *P<0.05 vs. O-CR.

5 DISCUSSÃO

A exposição intrauterina à hiperglicemia é um fator de risco significativo para o surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na prole (MANDERSON et al., 2002; ROCHA et al., 2005; SEGAR et al., 2009), dentre elas o diabetes do tipo 2 e a hipertensão arterial (DE QUEIROZ et al., 2017; RAMOS-ALVES et al., 2012a, 2012b). Esta última é um determinante importante para o desenvolvimento e progressão das complicações macro e microvasculares do diabetes mellitus e também em indivíduos que foram expostos à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina (DAGOGO-JACK, 2006). Neste estudo, as AMR da prole provenientes de ratos fêmeas diabéticas apresentaram resposta miogênica elevada aos 3 e 12 meses de idade, mas apenas as artérias dos animais com 12 meses apresentaram alterações estruturais na parede arterial, caracterizadas por: diâmetro interno reduzido, maior espessura de parede, aumento da relação parede:lúmen e da área de secção transversal. Estas alterações foram acompanhadas por uma diminuição da rigidez arterial e, conseqüentemente, por um aumento da complacência e da distensibilidade arterial. Esta menor rigidez parece ser decorrente de uma diminuição da expressão de colágeno tipo 1 na parede vascular, e possivelmente a uma menor quantidade de elastina na LEI. Considerando o tipo de remodelamento nas artérias do grupo O-DR, remodelamento hipertrófico para dentro, é possível sugerir que o mesmo é um fator contribuinte para uma maior resistência vascular e, conseqüentemente, para a elevação da pressão arterial.

Tem sido sugerido que a pressão arterial apresenta uma relação inversa com o baixo peso ao nascimento, a qual tem sido caracterizada, sobretudo, com a realização de experimentos de manipulação da dieta materna durante a gravidez (LAW; SHIELL, 1996; HUXLEY; SHIELL; LAW, 2000). Um estudo publicado por Canavan & Goldspink (1988) demonstrou que a hiperglicemia severa durante a gestação suprime o crescimento fetal, associado a uma menor síntese proteica. No presente estudo, o grupo O-DR apresentou baixo peso corporal ao nascimento comparado ao grupo O-CR. Ademais, a pressão arterial média dos animais O-DR como 12 meses de idade mostrou-se aumentada em relação ao grupo O-CR de mesma idade, embora nenhuma alteração na pressão arterial tenha sido detectada nos animais O-DR com 3 meses. Estudos anteriormente publicados pelo grupo de

pesquisa do Laboratório de Reatividade Vascular da UFPE corroboram estes achados. Em um modelo similar ao utilizado no presente estudo, foi demonstrado que a gravidade do distúrbio (hiperglicemia materna) pode influenciar o crescimento fetal e, portanto, o peso ao nascimento (NEHIRI et al., 2008). Assim, o diabetes materno é capaz de produzir prole com elevado (ROCHA et al., 2005; NEHIRI et al., 2008) ou baixo (GRILL et al., 1991; PORTO et al., 2010) peso ao nascimento. A primeira tende a ser proveniente de mães com hiperglicemia leve, enquanto a segunda é proveniente de mães com hiperglicemia grave (WICHI et al., 2005).

A hiperglicemia durante a gestação leva à resistência à insulina na prole (BLONDEAU et al., 2011; SEGAR et al., 2009), provocando vasoconstrição, inflamação, predispondo à trombose e à hipertensão (CHAHWALA; ARORA, 2009). Como citado anteriormente, os ratos com 3 meses de idade provenientes de mães diabéticas não apresentaram mudanças significativas da pressão arterial. Entretanto, os ratos O-DR com 12 meses tiveram a pressão arterial elevada em comparação com o grupo O-CR, como previamente demonstrado por Nehiri et al. (2008). Apesar de normotensos, o grupo O-DR com 3 meses de idade apresentou prejuízo do relaxamento dependente do endotélio (disfunção endotelial) em artérias de resistência da circulação mesentérica em comparação ao grupo O-CR (RAMOS-ALVES et al., 2012a). Este prejuízo da função endotelial nas artérias do grupo O-DR foi intensificado aos 6 e 12 meses de idade, o qual foi relacionado ao aumento da vasoconstrição adrenérgica e ao desenvolvimento de hipertensão arterial (RAMOS-ALVES et al. 2012a,b). Como amplamente demonstrado, a disfunção endotelial é um processo capaz de predispor o indivíduo a eventos trombogênicos, inflamatórios e ateroscleróticos, além de aumentar a resistência periférica e a pressão arterial (FÉLÉTOU, VANHOUTTE, 2006).

Apesar de estar bem caracterizado o efeito da hiperglicemia materna sobre a função vascular, existem poucas evidências relacionadas aos efeitos desse insulto sobre a estrutura e/ou as propriedades mecânicas da parede arterial da prole adulta. Sendo assim, neste estudo foram realizados experimentos com artérias de terceira ordem da circulação mesentérica (AMR) de animais O-CR e O-DR com 3 e 12 meses de idade, com o intuito de avaliar as possíveis modificações na estrutura e na mecânica destas artérias. Sob condições passivas, os resultados aqui obtidos

demonstram que a exposição à hiperglicemia materna não foi capaz de modificar as propriedades estruturais (diâmetros interno e externo, relação parede:lúmen, espessura da parede e área de secção transversal) das AMR dos animais com 3 meses de idade. Entretanto, nas AMR do grupo O-DR com 12 meses de idade, foi observado redução no diâmetro interno (sem alteração do diâmetro externo), acompanhado de aumento da relação parede:lúmen, da espessura de parede e da área de secção transversal, quando comparadas ao grupo O-CR de mesma idade. Em conjunto, os resultados obtidos no grupo O-DR 12 meses indicam um remodelamento vascular do tipo hipertrófico para dentro. Este tipo de remodelamento é comumente encontrado em vasos de resistência de modelos de hipertensão arterial induzido por infusão crônica de angiotensina II (GRIFFIN et al., 1991; LEVER et al., 1993; MULVANY et al., 2002) e de glicemia leve (BOUVET et al., 2007), assim como em artérias coronárias de camundongos diabéticos db/db, as quais apresentam aumento no número de células do músculo liso vascular (KATZ et al., 2011; TRASK et al., 2012).

O remodelamento hipertrófico para dentro observado nas AMR da prole O-DR 12 meses parece representar, assim como em outros modelos com hipertensão arterial, um mecanismo contribuinte para a manutenção do processo hipertensivo. Esta conclusão se baseia no fato de que nessas artérias ocorreu uma diminuição do diâmetro interno, associado ao aumento da relação parede:lúmen; duas alterações intimamente ligadas ao aumento da resistência vascular periférica. De acordo com a Equação de Poiseuille, a resistência vascular varia inversamente proporcional à quarta potência do raio; sendo esta uma função das propriedades mecânicas vasculares ativas e passivas. Considerando um dado nível de ativação das células musculares lisas e que este produz uma determinada força por área de secção transversal, a pressão contra a qual o vaso irá contrair, de acordo com a Lei de Laplace, é proporcional à relação parede:lúmen ou mais especificamente à relação média:lúmen (MULVANY, 1984). Assim, este parâmetro pode ser considerado como um dos mecanismos que contribuem para o aumento da resistência vascular periférica e dessa forma para a manutenção da pressão arterial elevada.

A vasoconstrição crônica, a qual pode ser produzida por alterações funcionais da parede vascular, dentre elas a disfunção do endotélio e o aumento da resposta

miogênico, induz remodelamento das pequenas artérias de resistência, resultando em diminuição do diâmetro luminal e em aumentos adicionais da resistência vascular (BAKKER et al., 2002, 2004, 2005; DICKINSON et al., 2013; LAURENT; BOUTOUYRIE, 2015). A resposta miogênica é um importante determinante da resistência e, em ultima instância, da pressão arterial. Ela se refere à capacidade intrínseca de pequenas artérias de resistência em responder a uma gama de pressões fisiológicas com um nível de contração, independente das influências neuro-humorais (MARTINEZ-LEMUS et al., 2005). No presente estudo, as AMR do grupo O-CR não apresentaram resposta miogênica, o que é compatível com estudos previamente publicados (BRIONES et al., 2003). Entretanto, as AMR do grupo O-DR responderam com contração ao aumento da pressão intravascular, o que é compatível com a resposta miogênica. Esta resposta foi observada até mesmo nas AMR do grupo O-DR 3 meses (que não apresentaram mudança estrutural), permanecendo inalterada até os 12 meses de idade. Portanto, baseado nestes resultados é possível postular que a resposta miogênica a partir dos 3 meses de idade possa contribuir para as alterações funcionais observadas nas AMR do grupo O-DR, além de contribuir para o desenvolvimento da hipertensão a partir dos 6 meses de idade (RAMOS-ALVES et al., 2012a, 2012b). Além disso, é possível sugerir que esta resposta miogênica possa ser um fator contribuinte para o remodelamento vascular observado mais tardiamente (aos 12 meses de idade), uma vez que alterações desta resposta têm impacto sobre a estrutura vascular (IZZARD, 1995; 2005). É importante ainda ressaltar que além do tônus miogênico, as AMR da prole O-DR com 3 meses de idade também apresentam redução da resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio, associada a mecanismos inflamatórios da parede arterial decorrente do aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) (RAMOS-ALVES et al., 2012a, 2012b).

A via da COX-2 é uma fonte importante de espécies reativas de oxigênio (EROs) em várias situações de risco cardiovascular, incluindo a hipertensão arterial (HERNANZ et al., 2014; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; VIRDIS; TADDEI, 2016). A COX-2 converte o ácido araquidônico em prostaglandina H_2 que depois é transformada em prostanóides a partir de enzimas específicas; este processo também resulta na geração de EROs, sobretudo quando esta via está super-estimulada. A produção destas espécies reativas, via COX-2, poderia ser uma das

responsáveis pelo desenvolvimento da hipertrofia nas artérias de resistência da prole exposta à hiperglicemia materna. As EROs desempenham um importante papel fisiológico no controle do tônus e da estrutura vascular e também podem contribuir para mecanismos patológicos relacionados à disfunção endotelial, inflamação e remodelamento vascular (AGUADO et al., 2015). O remodelamento arterial é induzido por interações dinâmicas entre fatores de crescimento locais, substâncias vasoativas locais e circulantes e estímulos hemodinâmicos. A identificação de mediadores envolvidos no remodelamento vascular vem crescendo nas últimas décadas; no entanto, até hoje, sabe-se que angiotensina II, citocinas, prostanoídes e EROs têm um papel fundamental (RENNA et al., 2013). As EROs são capazes de induzir proliferação e migração das células do músculo liso vascular por vias de sinalização intracelular distintas.

Baseado nas evidências descritas anteriormente, é provável que em vasos de resistência da prole O-DR com 12 meses, a alteração da geometria arterial observada no presente estudo represente um mecanismo adaptativo para redução da tensão de parede. A lei de Laplace estabelece a relação entre a tensão de parede, a pressão transmural e a espessura da parede dos vasos sanguíneos (GLAGOV et al., 1992). Esta lei é de fundamental importância para entender algumas características do sistema cardiovascular e, principalmente, a fisiopatologia do processo de remodelamento da parede arterial (LEHOUX; CASTIER; TEDGUI, 2006). De acordo com esta lei, a tensão de parede (T) é igual à diferença de pressão intravascular e extravascular (pressão transmural, P) multiplicada pelo raio (R) e dividido pela espessura de parede (EP) vezes 2 ($T = P \times R / 2EP$); portanto, é inversamente proporcional ao diâmetro interno. Os resultados aqui obtidos demonstraram que o diâmetro interno foi reduzido e a espessura de parede foi aumentada nas AMR da prole O-DR com 12 meses em comparação ao grupo O-CR. Estas alterações explicam o menor estresse de parede observado nas artérias do grupo O-DR em resposta ao aumento da pressão intravascular. De acordo com dados da literatura obtidos em outros modelos, estas alterações estruturais funcionam como um mecanismo de proteção da parede vascular contra possíveis danos ocasionados pelo aumento da pressão transmural e, conseqüentemente, da tensão de parede. Na literatura, a redução ou a não alteração deste parâmetro está relacionada com um balanço geométrico devido a uma maior espessura da parede,

visto em SHR (BRIONES et al., 2003; INTENGAN et al., 1999; QIU et al., 1995) e em ratos com idade avançada (BRIONES; SALAICES; VILA, 2007), corroborando com os achados do presente estudo.

Diversos estudos previamente publicados demonstraram que o remodelamento vascular na hipertensão cursa com alterações das propriedades mecânicas da parede arterial (BAUMBACH; HEISTAD, 1989; BRIONES et al., 2003; HAJDU; BAUMBACH, 1994; INTENGAN et al., 1999b; IZZARD et al., 2003). Estas propriedades, por sua vez, sofre forte influência da MEC, a qual depende de vários processos biológicos como adesão, proliferação e migração celular (TUÑÓN; RUIZ-ORTEGA; EGIDO, 2000). As interações funcionais e estruturais entre as proteínas da MEC e as células musculares lisas, através de moléculas de adesão, por exemplo, são importantes na manutenção da integridade vascular, e qualquer modificação contribui para alterações na rigidez da parede arterial. Na hipertensão, devido às alterações dos componentes da MEC e das correspondentes moléculas de adesão, as interações entre as células musculares lisas e as proteínas da MEC se modificam quantitativamente e/ ou topograficamente, produzindo reorganização das células do músculo liso e uma reestruturação da parede vascular (INTENGAN et al., 1999b).

O colágeno representa uma das principais proteínas da MEC e um dos determinantes importantes do módulo elástico (BANK et al., 1996). Em alguns modelos de hipertensão, o aumento da deposição de colágeno é apontado como uma das principais causas para o aumento da rigidez arterial (INTENGAN et al., 1999b; LAURANT; TOUYZ; SCHIFFRIN, 1997). No presente estudo, comparando o comportamento da relação *stress-strain* entre os grupos O-CR e O-DR 12 meses é possível observar que em todos os pontos superiores da curva existe um desvio para a direita no grupo O-DR, com redução do valor de β (Incremental elastic modulus), o que indica uma diminuição da rigidez arterial. A relação *stress-strain* é uma medida que depende da geometria do vaso e da complacência vascular e descreve a adaptação entre as forças que agem na parede arterial. Está bem documentado que a parte inicial da curva (correspondente à relação *stress-strain* em valores mais baixos de pressão) reflete o grau de estiramento das fibras elásticas, enquanto que a parte superior da curva (correspondente à relação *stress-strain* em

valores mais altos de pressão) reflete a rigidez das fibras elásticas em seu grau máximo de estiramento, assim como o grau de estiramento das fibras colágenas, que nesse caso é muito restrito (DOBRIN, 1978). No presente estudo, a redução da rigidez arterial no grupo O-DR pode ser explicada pela diminuição da expressão de colágeno tipo 1 detectada nas AMR do grupo O-DR 12 meses, mesmo estes animais não apresentando alteração do conteúdo total de colágeno (determinado através da técnica de *Picro sirius*). O mecanismo responsável por essa menor expressão de colágeno nas artérias de animais O-DR pode estar relacionado a um aumento da sua degradação pela collagenase MMP-9, mesmo que estes animais tenham apresentado redução da expressão da collagenase MMP-2. Um estudo publicado por Yabluchanskiy et al. (2013) demonstrou que a MMP-9 é induzida precocemente com o desenvolvimento da hipertensão, contribuindo para a quebra do colágeno e para a distensibilidade arterial. Esta tem sido implicada na modulação do tônus vascular através da liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor (TANUS-SANTOS et al., 2000; TANUS-SANTOS et al., 2000; FERNANDEZ-PATRON et al., 2001; VAN DEN STEEN et al., 2002; BATTISTINI, 2003). Além disso, a expressão da MMP-9 está aumentada nas artérias com alta pressão em comparação com os vasos sob pressão mais baixa (LEHOUX et al., 2004), e pode ser regulada positivamente pelas EROs (RAJÁGOPALAN et al., 1996). É importante ressaltar que o resultado observado nas artérias dos animais O-DR 12 meses contrasta com a maioria dos estudos em modelos animais de hipertensão, onde é observado desvio à esquerda da relação *stress-strain* (maior rigidez) decorrente da maior deposição de colágeno na parede arterial (BRIONES; SALAICES; VILA, 2007; KIZU et al., 2003; WIGG et al., 2004).

O remodelamento da MEC é influenciado tanto por forças hemodinâmicas quanto por fatores extrínsecos, como a hiperglicemia, as citocinas inflamatórias, o estresse oxidativo e alguns fatores de crescimento (ZIEMAN; MELENOVSKY; KASS, 2005). O balanço entre as MMPs e os seus inibidores teciduais (TIMPs) possui um importante papel no remodelamento vascular (NAGASE; WOESSNER, 1999). Um desbalanço entre eles pode levar ao acúmulo ou à degradação da MEC (KENICHI et al., 2004). Os resultados aqui obtidos mostram que a expressão do TIMP-1 e -2 não apresentam diferença significativa entre os grupos O-CR e O-DR, mesmo com a expressão reduzida de MMP-2 e com a expressão elevada da MMP-9. Isso indica

que as alterações observadas na expressão das MMPs no grupo O-DR independem do conteúdo destas TIMPs, como previamente descrito por Bercei et al. (2004).

A MMP-9 processa várias citocinas, incluindo o TNF- α , a IL-1 β e o TGF- β (YABLUCHANSKIY et al., 2013). Esta última é uma citocina anti-inflamatória que é liberada no espaço extracelular na forma latente. O TGF- β é reticulada à MEC e sua maturação está associada a vários mecanismos, incluindo proteólise. A MMP-9 é capaz de clivar a pró-forma latente do TGF- β no seu estado ativo (YU; STAMENKOVIC, 2000). Esta citocina multifuncional é capaz de regular o crescimento e a diferenciação de muitos tipos celulares, bem como regular seu ambiente na parede do vaso sanguíneo (YABLUCHANSKIY et al., 2013). Sua produção pelo endotélio e/ou músculo liso é estimulada por forças físicas, fatores de crescimento e substâncias vasoconstritoras. Na hipertensão, a transcrição do gene TGF- β 1 é mais elevada por uma combinação de estímulos físicos e químicos, com a citocina atuando para aumentar a produção de proteínas da MEC ou para modular o crescimento celular do músculo liso, produzindo hipertrofia, poliploidia ou proliferação (STOUFFER; OWERS, 1994). O TGF- β 1 é um provável contribuinte para o desenvolvimento de hipertrofia vascular na hipertensão (BOBIK, 2006).

Sabendo que o TGF- β 1 é um importante fator de crescimento envolvido no remodelamento vascular na hipertensão (BOBIK, 2006; GAO et al., 2014), no presente estudo foi investigado se a exposição intrauterina ao diabetes mellitus foi capaz de alterar a expressão desta citocina em AMR de animais com 12 meses de idade, visto que estes apresentam hipertensão e remodelamento vascular. Os resultados obtidos mostram que esta prole apresentou aumento na expressão deste fator de crescimento. Sabe-se que a MMP-9 ativa o TGF- β 1, dados que são consistentes com observações anteriores em vários tipos de células *in vitro*. Assim, o aumento da ativação da MMP-9 e da expressão do TGF- β 1 associado à exposição *in utero* à hiperglicemia materna, além do fator idade, parece ser responsável por regular a proteólise de proteínas da matriz, como a elastina e o colágeno (o que poderia estar contribuindo para uma maior complacência nestes animais), aumentando consideravelmente o potencial de invasão das células do músculo liso vascular dentro da parede arterial, causando remodelamento hipertrófico.

Como já mencionado, o diâmetro interno vascular depende das propriedades ativas da parede arterial em resposta à pressão transmural e da complacência desta parede. As alterações crônicas da estrutura vascular são coletivamente referidas como remodelamento e devem ter efeitos importantes nas propriedades mecânicas dos vasos, como complacência e distensibilidade (LEVY et al., 1989), principalmente na presença de hipertensão. A complacência é uma função de proteção do vaso; é a capacidade do vaso distender-se em resposta a aumentos de pressão intravascular, dependendo, por sua vez, da geometria e da rigidez dos elementos que constituem a parede vascular (VAN BORTEL et al., 1995). Esta pode ser reduzida caso o diâmetro interno diminua, como acontece na hipertensão arterial, sendo este um exemplo de efeito dependente da geometria, ou pode sofrer modificações em consequência de mudanças do módulo elástico. Já a distensibilidade arterial representa a complacência corrigida para o tamanho do lúmen vascular e depende da camada média e das propriedades elásticas intrínsecas da parede vascular (CRIJNS et al., 1999; VAN BORTEL et al., 1995). Os resultados aqui apresentados mostram que a complacência e a distensibilidade das AMR em função da pressão intravascular estão significativamente aumentadas no grupo O-DR com 12 meses de idade, mesmo com o diâmetro interno reduzido. Supõe-se que essas mudanças mecânicas compensem a hipertrofia e o estreitamento do lúmen presente nestes animais, como observados em outros modelos (CARACUEL et al., 2012; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001; OGALLA et al., 2015).

Modificações na rigidez vascular também estão associadas a mudanças estruturais da lâmina elástica interna (LEI), como alterações do número e da área das fenestras (BOUMAZA et al., 2001; BRIONES et al., 2003; JIMÉNEZ-ALTAYÓ et al., 2007). Os resultados aqui revelam que a LEI das artérias do grupo O-DR 12 meses apresenta menor número de fenestras, contrastando com o aumento de distensibilidade observado nestas artérias. Apesar disso, foi observado um aumento da área das fenestras e uma menor fluorescência da elastina na LEI das artérias do grupo O-DR, embora estas diferenças não tenham alcançado significância estatística. Estes resultados ajudam a explicar a maior distensibilidade e complacência nas artérias do grupo O-DR 12 meses. Em artérias de resistência de SHR, a redução da área das fenestras, com consequente aumento da área ocupada pela elastina na LEI está associada à maior rigidez arterial (BRIONES et al., 2003).

Apesar das evidências observadas e publicadas anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Reatividade Vascular da UFPE de que a exposição da prole ao diabetes mellitus durante o período gestacional está envolvida no desenvolvimento de alterações funcionais em artérias mesentéricas, faz-se necessário a realização de mais estudos que possam esclarecer os mecanismos pelos quais esta exposição induz remodelamento vascular na prole.

6 CONCLUSÃO

Os resultados experimentais obtidos no presente estudo demonstram que a exposição intrauterina ao diabetes mellitus materno é capaz de provocar alterações nas propriedades miogênicas, mecânicas e estruturais na prole adulta. Estas modificações estruturais, que se caracterizam por remodelamento hipertrófico para dentro, acompanhadas de complacência e distensibilidade aumentadas, podem ser uma forma de proteção da parede vascular aos danos ocasionados pelo aumento da pressão arterial. Portanto, este remodelamento vascular da prole exposta à hiperglicemia materna possivelmente contribui para a maior resistência vascular periférica e conseqüentemente para a manutenção da pressão arterial elevada nestes animais.

REFERÊNCIAS

ACETI, A. et al. The diabetic pregnancy and offspring blood pressure in childhood: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 55, n. 11, p. 3114–3127, 5 nov. 2012.

AERTS, L.; ASSCHE, F. A. V. Is gestacional diabetes an acquired conditions? **Journal Devel Biology**, v.1, p. 219-225, 1979.

AERTS, L.; VERCRUYSSSE, L.; VAN ASSCHE, F. A. The endocrine pancreas in virgin and pregnant offspring of diabetic pregnant rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 38, p. 9-19, 1997.

AGABITI-ROSEI, E. Structural and functional changes of the microcirculation in hypertension: influence of pharmacological therapy. **Drugs**, v. 63, n.1, p. 19-29, 2003.

AGUADO, A. et al. Reactive oxygen species and vascular remodeling in cardiovascular diseases. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 81, n. 2, p.129-144, 2015.

AKYOL, A.; MCMULLEN, S.; LANGLEY-EVANS, S. C. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. **The British journal of nutrition**, v. 107, n. 7, p. 964–978, 2012.

AL-AWAR, A. et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

ALBERTS, B. et al. Cell adhesion, cell junctions and the extracellular matrix. in: **Molecular Biology of cell**. 2ª edição, p. 791-836, 1989.

ALEXANDER, B. T. Fetal programming of hypertension. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R1–R10, jan. 2006.

AMMARGUELLAT, F. Z. et al. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 679–84, fev. 2002.

AMRI, K. et al. Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: In

vivo and in vitro studies. **Diabetes**, v. 48, n. 11, p. 2240–2245, 1999.

ANTONY, P. J. et al. Myoinositol ameliorates high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1098–1113, 2017.

ARENAS, L. A. S.; DE ZURBARÁN, C. B. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. **Salud Uninorte**, v. 16, p. 9–18, 2002.

ARRIBAS, S. M. et al. Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy. **Journal of Hypertension**, v. 15, n. 12, p. 1685–1693, 1997.

ARRIBAS, S. M.; HINEK, A.; GONZÁLEZ, M. C. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. v. 111, p. 771–791, 2006.

ASHTON, N. Perinatal development and adult blood pressure. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 33, n. 7, p. 731–40, 2000.

BANK, A. J. et al. Contribution of collagen, elastin, and smooth muscle to in vivo human brachial artery wall stress and elastic modulus. **Circulation**, v. 94, n. 12, p. 3263–3270, 1996.

BAKKER, E. N. T. P. et al. Inward Remodeling Follows Chronic Vasoconstriction in Isolated Resistance Arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 39, n. 1, p. 12–20, 2002.

BAKKER, E. N. T. P. et al. Activation of resistance arteries with endothelin-1: From vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. **Journal of Vascular Research**, v. 41, n. 2, p. 174–182, 2004.

BAKKER, E. N. T. P. et al. Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. **Circulation Research**, v. 96, n. 1, p. 119–126, 2005.

BARKER, D. .; BAGBY, S. Developmental Antecedents of Cardiovascular Disease: A Historical Perspective. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 9, p. 2537–2544, 2005.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, n. 6673, p. 564–567, 1989a.

BARKER, D. J. . et al. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, set. 1989b.

BARKER, D. J. P. Rise and fall of Western diseases. **Nature**, v. 338, n. 6214, p. 371–372, 1989.

BARKER, D. J. P. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n. 1, p. 62–67, 1993.

BARKER, D. J. P. Outcome of Low Birthweight. **Hormone Research**, v. 42, n. 4–5, p. 223–230, 1994.

BARKER, D. J. P. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v. 95, n. 2, p. 115–128, 1998.

BARKER, D.; OSMOND, C. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. **Lancet**, v. 1, p. 1077–1081, 1986.

BARKER, D.; OSMOND, C. Low birth weight and hypertension. **BMJ**, v. 297, n. July, p. 134–135, 1988.

BATTISTINI, B. Modulation and roles of the endothelins in the pathophysiology of pulmonary embolism. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 555-569, 2003.

BAUMBACH, G. L.; HAJDU, M. A. Mechanics and composition of cerebral arterioles in renal and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 21, n. 6 Pt 1, p. 816–826, 1993.

BAUMBACH, G. L.; HEISTAD, D. D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. **Hypertension**, v. 13, n. 6_pt_2, p. 968–972, 1989.

BAX, D. V. et al. Cell Adhesion to Fibrillin-1 Molecules and Microfibrils Is Mediated by $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ Integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34605–34616, 2003.

BERCELLI, S. A. et al. Differential expression and activity of matrix metalloproteinases

during flow-modulated vein graft remodeling. **Journal of Vascular Surgery**, v. 39, n. 5, p. 1084–1090, 2004.

BÉZIE, Y. et al. Connection of Smooth Muscle Cells to Elastic Lamellae in Aorta of Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 166–169, 1998.

BÉZIE, Y. et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 18, n. 7, p. 1027–1034, 1998.

BÉZIE, Y. et al. Molecular and cellular determinants of arterial stiffness: role of cell-matrix connections. *Pathologie-Biologie*, v. 47, n. 7, p. 669-676, 1999.

BIDANSET, D. J. et al. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 8, p. 5250–5256, 1992.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **The Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243–260, 2008.

BLOMFIELD, J.; FARRAR, J.F. The fluorescent properties of maturing arterial elastin. **Cardiovascular Research**, v. 3, n. 2, p. 161-170, 1969.

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, p. 83–93, 2005.

BLONDEAU, B. et al. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. **Diabetes Metabolism**. v. 37, n. 3, p. 245-251, 2011.

BOBIK, A. Transforming Growth Factor- β s and Vascular Disorders. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p. 1712–1720, 2006.

BOHR, D. F.; WEBB, R. C. Vascular Smooth Muscle Function and Its Changes in Hypertension. **The American Journal of Medicine**, v. 77, n. 4, p. 3–16, 1984.

BOUCHARD, L. et al. Leptin Gene Epigenetic Adaptation to Impaired Glucose Metabolism During Pregnancy. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2436–2441, 2010.

BOUMAZA, S. et al. Fenestrations of the Carotid Internal Elastic Lamina and Structural Adaptation in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 37, n. 4, p. 1101–1107, 2001.

BOUVET, C. et al. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 248–254, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASSARD, P.; AMIRI, F.; SCHIFFRIN, E. L. Combined Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptor Blockade on Vascular Remodeling and Matrix Metalloproteinases in Resistance Arteries. **Hypertension**, v. 46, n. 3, p. 598–606, 2005.

BRIONES, A. M. et al. Role of Elastin in Spontaneously Hypertensive Rat Small Mesenteric Artery Remodelling. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 1, p. 185–195, 2003.

BRIONES, A. M. et al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 1, p. H193–201, 2006.

BRIONES, A. M. et al. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 142–149, 2009.

BRIONES, A. M.; ARRIBAS, S. M.; SALAICES, M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. 2010.

BRIONES, A. M.; SALAICES, M.; VILA, E. Mechanisms underlying hypertrophic remodeling and increased stiffness of mesenteric resistance arteries from aged rats. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 7, p. 696–706, 2007.

BRUSH, J. E. et al. Angina Due to Coronary Microvascular Disease in Hypertensive Patients without Left Ventricular Hypertrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 20, p. 1302–1307, 1988.

BUND, S. J. Spontaneously hypertensive rat resistance artery structure related to myogenic and mechanical properties. **Clinical Science (London, England : 1979)**, v. 101, n. 4, p. 385–93, 2001.

BUNT, J. C.; TATARANNI, P. A.; SALBE, A. D. Intrauterine Exposure to Diabetes Is a Determinant of Hemoglobin A 1 c and Systolic Blood Pressure in Pima Indian Children. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 6, p. 3225–3229, 2005.

BURTON, C. Relation of Structure of the Wall. **Physiological Reviews**, v. 34, n. 5, p. 619–642, 1954.

CABRAL, E. V. et al. Perinatal Na⁺ Overload Programs Raised Renal Proximal Na⁺ Transport and Enalapril-Sensitive Alterations of Ang II Signaling Pathways during Adulthood. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43791, 2012.

CALDERON, I. M. P. et al. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas – relação com a macrosomia e o retardo do crescimento intra-uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.21, p.91-98, 1999.

CANAVAN JP, GOLDSPIK DF. Maternal diabetes in rats. II. Effects on fetal growth and protein turnover. **Diabetes**, v. 37, p. 1671-1677, 1988.

CANTOR, J. O. et al. Synthesis of crosslinked elastin by an endothelial cell culture. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 95, n. 4, p. 1381–1386, 1980.

CARACUEL et al. Transient mesenteric ischemia leads to remodeling of rat mesenteric resistance arteries. **Frontiers in Physiology**. v. 2, p. 118, 2012.

CARNES, W. H.; ABRAHAM, P. A.; BUONASSISI, V. Biosynthesis of elastin by an endothelial cell culture. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 90, n. 4, p. 1393–1399, 1979.

CASSON, I. F. et al. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. **Bmj**, v. 315, n. 7103, p. 275–278, 1997.

CASTRO, M. M. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v. 198, n. 2, p. 320–331, 2008.

CAZAROLLI, L. H. Estudo da atividade de flavonoides e de complexos de vanádio

na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana. [Dissertação]. Florianópolis: Mestrado em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis; 2004.

CHAHWALA, V.; ARORA, R. Cardiovascular Manifestations of Insulin Resistance. **American Journal of Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 14-28, 2009.

CHEN, M. M. et al. CTGF Expression is Induced by TGF- β in Cardiac Fibroblasts and Cardiac Myocytes: a Potential Role in Heart Fibrosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 10, p. 1805–1819, 2000.

CHIANG, H. Y. et al. Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 7, p. 1074–1079, 2009.

CHRISTENSEN, K. L.; MULVANY, M. J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2001.

COATS, P. et al. The use of fluorescent nuclear dyes and laser scanning confocal microscopy to study the cellular aspects of arterial remodelling in human subjects with critical limb ischaemia. **Experimental physiology**, v. 88, n. 4, p. 547–54, 2003.

COLLINS, G. J.; ANDERSEN, C. A. Complex Cerebral Revascularization. **Archives of Surgery**, v. 113, n. 6, p. 706–709, 1978.

COUTTS, A. et al. Release of biologically active TGF- β from airway smooth muscle cells induces autocrine synthesis of collagen. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 5, p. L999–L1008, 2001.

CRIJNS, F. R. L. et al. Mechanical properties of mesenteric arteries in diabetic rats: consequences of outward remodeling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 5, p. H1672–H1677, 1999.

DABELEA, D. et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: A Study of Discordant Sibships. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 2208–2211, 2000.

DABELEA, D.; CRUME, T. Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1849–1855, 2011.

DAGOGO-JACK, S. Primary prevention of cardiovascular disease in diabetic

patients. *Cardio Q*, v. 12, p. 20, 2006.

DAMASCENO, D. C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v.72, p.235-242, 2002.

DAMIANO, V. et al. Secretion of elastin in the embryonic chick aorta as visualized by immunoelectron microscopy. **Collagen and related research**, v. 4, n. 2, p. 153–64, 1984.

DAVIES, A. A. et al. Low Birth Weight Is Associated With Higher Adult Total Cholesterol Concentration in Men. Findings From an Occupational Cohort of 25 843 Employees. **Circulation**, v. 110, p. 1258–1262, 2004.

DAVIS, E. C. Endothelial cell connecting filaments anchor endothelial cells to the subjacent elastic lamina in the developing aortic intima of the mouse. **Cell and Tissue Research**, v. 272, n. 2, p. 211–219, 1993.

DAVIS, M. J.; HILL, M. A. Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 387–423, 1999.

DE ANGELIS, K. et al. Cardiovascular Control in Experimental Diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 35, n. 9, p.1091-1100, 2002.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. **Autonomic Neuroscience**. v. 145, n. 1-2, p. 3-10, 2009.

DE MEY, J. G. R. et al. Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 3, p. H1022–H1027, 2005.

DE QUEIROZ, D. B. et al. Alterations in perivascular innervation function in mesenteric arteries from offspring of diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 19, p. 4699–4713, 2015.

DE QUEIROZ, D. B. et al. Losartan reverses COX-2-dependent vascular dysfunction in offspring of hyperglycaemic rats. **Life Sciences**, v. 184, p. 71–80, 2017.

DE SÁ, F. G. et al. Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2. **Experimental Physiology**, v. 102, n. 8, p. 1019–1036, 2017.

DE SOUZA BURIOL, V. C. et al. Temporal evolution of the risk factors associated with low birth weight rates in Brazilian capitals (1996-2011). **Population Health Metrics**, v. 14, n. 1, p. 15, 2016.

DEATH, A. K. et al. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. **Atherosclerosis**, v. 168, n. 2, p. 263–269, 2003.

deBLOIS, D. et al. Angiotensin II induction of osteopontin expression and DNA replication in rat arteries. **Hypertension**, v. 28, n. 6, p.1055-1063, 1996.

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

DELFINO, V. D. A. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DENG, L. Y.; SCHIFFRIN, E. L. Morphological and functional alterations of mesenteric resistance arteries in early renal hypertension in rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, n. 4 Pt 2, p. H1171–H1177, 1991.

DENG, L. Y.; SCHIFFRIN, E. L. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **The American journal of physiology**, v. 262, n. 6 Pt 2, p. H1782–H1787, 1992.

DHANANJAYAN, I. et al. Ameliorating effect of betanin, a natural chromoalkaloid by modulating hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities and glycogen content in streptozotocin–nicotinamide induced experimental rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1069-1079, 2017.

DIB, A. et al. In Utero Exposure to Maternal Diabetes Is Associated With Early Abnormal Vascular Structure in Offspring. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. April, p. 1–11, 2018.

DICKINSON, M. G. et al. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 1, p. L1–L14, 2013.

DIEZ, J. Emerging role of matrix metalloproteinases in the pathophysiology of cardiac diseases. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 5, p. 291–294, 2002.

DOBRIN, P. B. Mechanical properties of arteries. **Physiological Reviews**, v. 58, n. 2, p. 397–460, 1978.

DONG, M. et al.. Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 55, p. 111-116, 2013.

D'USCIO, L. V. et al. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 905-911, 1997.

EBLE, J.; NILAND, S. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 12, p. 1385–1400, 2009.

EDWARDS, D. et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **The EMBO**, v. 6, n. 7, p. 1899–1904, 1987.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. May, p. 1–7, 2004.

EL-BASSOSSY, H. M. et al. Geraniol alleviates diabetic cardiac complications: Effect on cardiac ischemia and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1025-1030, 2017.

ELEAZU, C.O et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 60, 2013.

EL-OSTA, A. et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 11, p. 2683–2683, 2008.

EPSTEIN, F. H.; BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 19, p. 1286–1292, 1994.

ERGUL, A. et al. Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 5, p. H2225–H2232, 2003.

ERGUL, A. et al. Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 9, p. 775–782, 2004.

ERIKSSON, J. et al. Fetal and Childhood Growth and Hypertension in Adult Life. **Hypertension**, v. 36, p. 790–795, 2000.

ERIKSSON, J. G. et al. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease : longitudinal study. **BMJ**, v. 318, n. February, p. 427–431, 1999.

ET-TAOUIL, K.; SAFAR, M.; PLANTE, G. E. Mechanisms and consequences of large artery rigidity. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 205–211, 2003.

FARRAR, D. Hyperglycemia in pregnancy: prevalence, impact, and management challenges. **Internacional Journal of Women's Health**, v. 8, p. 519-527, 2016.

FEGAN, P. G. et al. Capillary pressure in subjects with type 2 diabetes and hypertension and the effect of antihypertensive therapy. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1111–1117, 2003.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143–153, 2004.

FERNANDEZ-PATRON, C. et al. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1. **Faseb Journal**, v. 15, n. 12, p. 2230-2240, 2001.

FETITA, L. S. et al. Review: Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 3718–3724, 2006.

FLAMANT, M. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Early Hypertensive Vascular Remodeling. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 212–218, 2007.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**, v. 62, n. 2, p. 347–504, 1982.

FOLKOW, B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. **Hypertension**, v. 16, n. 1, p. 89–101, 1990.

FOLKOW, B. **Hypertensive structural changes in systemic precapillary resistance vessels: how important are they for in vivo haemodynamics?**, 1995.

FOLKOW, B.; GRIYBY, G.; THULESIUS, O. Adaptive Structural Changes of the Vascular Walls in Hypertension and their Relation to the Control of the Peripheral Resistance. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 44, n. 3–4, p. 255–272, ago. 1958.

FUHRMANN, K. et al. Prevention of congenital malformations in infants of insulin-dependent diabetic mothers. **Diabetes Care**, v. 6, n. 3, p. 219–223, 1983.

FUJIO, K. et al. Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 9, p. 917–922, 2016.

FUJISAWA, Y. et al. Diabetic pregnancy in rats leads to impaired glucose metabolism in offspring involving tissue-specific dysregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression. **Life Sciences**, v. 81, n. 9, p. 724–731, 2007.

GALJAARD, S.; DEVLIEGER, R.; VAN ASSCHE, F. A. Fetal growth and developmental programming. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 41, n. 1, p. 101–105, 2013.

GAO, J. et al. TGF- β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 72, 2014.

GATTONE, V. H.; MILLER, B. G.; EVAN, A. P. Microvascular smooth muscle cell quantitation from scanning electron microscopic preparations. **The Anatomical Record**, v. 216, n. 3, p. 443–447, 1986.

GEORGE, S. J. et al. Transforming Growth Factor- β Is Activated by Plasmin and Inhibits Smooth Muscle Cell Death in Human Saphenous Vein. **Journal of Vascular Research**, v. 42, n. 3, p. 247–254, 2005.

GERRITY, R. G.; CLIFF, W. J. The aortic tunica intima in young and aging rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 16, n. 3, p. 382–402, 1972.

GIACHELLI, C. M. et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat

arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p. 1686–1696, 1993.

GIBBONS, G. H.; DZAU, V. J. The emerging concept of vascular remodeling. **The New England journal of medicine**, v. 330, n. 20, p. 1431–8, 1994.

GLAGOV, S. et al. Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. **Journal of Hypertension Suppl**, v. 10, n. 6, p. S101-104, 1992.

GOMES, G. N.; GIL, F. Z. Prenatally programmed hypertension: Role of maternal diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 899–904, 2011.

GOUMANS, M. J.; LIU, Z.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. **Cell Research**, v. 19, p. 116–127, 2009.

GREENSTEIN, A. S. et al. Eutrophic remodeling of small arteries in type 1 diabetes mellitus is enabled by metabolic control: A 10-year follow-up study. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 134–141, 2009.

GRIBBIN, B.; PICKERING, T. G.; SLEIGHT, P. Arterial Distensibility in Normal and Hypertensive Man. **Clinical Science**, v. 56, n. 5, p. 413–417, 1979.

GRIFFIN, S. A. et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 626-635, 1991.

GRILL, V. et al. Influence of severe diabetes mellitus early in pregnancy in the rat: effects on insulin sensitivity and insulin secretion in the offspring. **Diabetologia**, v. 34, n. 6, p. 373–378, 1991.

GUNDALA, N. K. V. et al. Arachidonic acid (AA) and lipoxin A4 (LXA4) attenuate streptozotocin-induced cytotoxicity to RIN5F cells in vitro and type 1 and type 2 diabetes mellitus in vivo. **Nutrition**, 2016.

HAAS, T. L. et al. Involvement of MMPs in the outward remodeling of collateral mesenteric arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 4, p. H2429–H2437, 2007.

HAJDU, M. A.; BAUMBACH, G. L. Mechanics of large and small cerebral arteries in chronic hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory**

Physiology, v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1027–H1033, 1994.

HAKIM, Z. S.; PATEL, B. K.; GOYAL, R. K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.41, n.4, p. 353-360, 1997.

HALES, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 303, n. 6809, p. 1019–22, 1991.

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

HALPERN, W.; MULVANY, M. J.; WARSHAW, D. M. Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of arterial resistance vessels. **The Journal of Physiology**, v. 275, n. 1, p. 85–101, 1978.

HARRIS, A. K. et al. Type 2 Diabetes Causes Remodeling of Cerebrovasculature via Differential Regulation of Matrix Metalloproteinases and Collagen Synthesis Role of Endothelin-1. **Diabetes**, v. 54, n. 9, p. 2638-2644, 2005.

HASDAI, D. et al. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. **Circulation**, v. 96, n. 10, p. 3390-3395, 1997.

HAYDEN, M. R.; SOWERS, J. R.; TYAGI, S. C. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: The matrix preloaded. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, p. 1–20, 2005.

HEAGERTY, A. M. et al. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. **Hypertension**, v. 21, n. 4, p. 391–397, 1993.

HEAGERTY, A. M. Predicting hypertension complications from small artery structure. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 939–940, 2007.

HEAGERTY, A. M.; HEERKENS, E. H.; IZZARD, A. S. Small artery structure and function in hypertension. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 5, p. 1037–1043, 2010.

HEERKENS, E. H. J.; IZZARD, A. S.; HEAGERTY, A. M. Integrins, vascular remodeling, and hypertension. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 1–4, 2007.

HERNANZ, R. et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. **Clinical Science** (Lond), v. 126, p. 111-21, 2014.

HERR, R. R.; EBLE, T. E.; JAHNKE, H. K. Isolation and characterization of streptozotocin. In *Antibiotic Annual 1959-1960*. New York: Antibiobtica, p. 236-240, 1960.

HINEK, A. et al. Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 2083–2094, 1991.

HIRST, G. D.; EDWARDS, F. R. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. **Physiological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 546–604, 1989.

HOLEMANS, K. et al. Raised saturated-fat intake worsens vascular function in virgin and pregnant offspring of streptozotocin-diabetic rats. **The British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 285–296, 2000.

HOLEMANS, K. et al. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Diabetologia**, v. 42, n. 1, p. 81–89, 1999.

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

HU, Y. et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1258–1265, 2004.

HUXLEY RR, SHIELL AW, LAW CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 815-831, 2000.

INTENGAN, H. D. et al. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 569–574, 1999a.

INTENGAN, H. D. et al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, n. 22, p. 2267–75, 1999b.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Structure and Mechanical Properties of Resistance Arteries in Hypertension Role of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Determinants. p. 312–319, 2000.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 581–587, 2001.

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

IZZARD, A. S. et al. Myogenic and structural properties of cerebral arteries from the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 4, p. H1489–H1494, 2003.

IZZARD, A. S. et al. Small artery structure and hypertension: Adaptive changes and target organ damage. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 2, p. 247–250, 2005.

JACOB, M. P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, n. 5–6, p. 195–202, 2003.

JAKOWLEW, S. B. Transforming Growth Factor-Beta in Cancer and Metastasis, v. 25, n. 3, p. 435–457, 2006.

JENSEN, D. M. et al. Outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a nationwide, population-based study. **Diabetes care**, v. 27, n. 12, p. 2819–23, 2004.

JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F. et al. Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. H628–H635, 2007.

JOHNSON, J. L. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 5, n. 2, p. 265–282, 2007.

JONES, J. E. et al. Mechanisms of Fetal Programming in Hypertension. **International Journal of Pediatrics**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

JUNOD, A. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201–205, 1967.

KARRER, H. E. An electron microscope study of the aorta in young and in aging mice. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 5, n. 1, p. 1–27, 1961.

KARSDAL, M. A. et al. Matrix Metalloproteinase-dependent Activation of Latent Transforming Growth Factor- β Controls the Conversion of Osteoblasts into Osteocytes by Blocking Osteoblast Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44061–44067, 2002.

KATKHUDA, R. et al. Sex-specific programming of hypertension in offspring of late gestation diabetic rats. **Pediatric Research**, v. 74, n. 4, p. 352–361, 2012.

KATZ, P. S. et al. Coronary arterioles in type 2 diabetic (db/db) mice undergo a distinct pattern of remodeling associated with decreased vessel stiffness. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 6, p. 1123–1134, 2011.

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. et al. Prevalence of metabolic markers of insulin resistance in offspring of gestational diabetes pregnancies. **Pediatric Diabetes**, v.9, p. 53–59, 2008.

KENICHI, M. et al. Renal synthesis of urokinase type-plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 in diabetic nephropathy in rats: Modulation by angiotensin-converting–enzyme inhibitor. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 144, n. 2, p. 69–77, 2004.

KHORRAM, O. et al. Excess Maternal Glucocorticoids in Response to In Utero Undernutrition Inhibit Offspring Angiogenesis. **Reproductive Sciences**, v. 21, n. 5, p. 601–611, 2014.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 14, p. 2817–2828, 2002.

KIZU, A. et al. Arterial wall stiffness is associated with peripheral circulation in

patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 87–91, 2003.

KLAHR, S.; MORRISSEY, J. Progression of chronic renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 41, n. S1, p. S3–S7, 2003.

KORNER, P. I.; ANGUS, J. A. Vascular remodeling. **Hypertension**, v. 29, n. 4, p. 1065–1066, 1997.

KORSGAARD, N.; MULVANY, M. J. Cellular Hypertrophy in Mesenteric Resistance Vessels from Renal Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 12, n. 2, p. 162–167, 1988.

LANGILLE, B.; BENDECK, M.; KEELEY, F. Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. **American Journal of Physiology**, v. 256, n. 4 Pt 2, p. H931–939, 1989.

LANGILLE, B. L. Hemodynamic factors and vascular wall disease. In E. Silver (Ed.), **Cardiovascular Pathology**, p. 131–154, 1991.

LAPPAS, M. et al. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 12, p. 3061–3100, 2011.

LAURANT, P.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Effect of Pressurization on Mechanical Properties of Mesenteric Small Arteries from Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Vascular Research**, v. 34, n. 2, p. 117–125, 1997.

LAURENT, S.; BOUTOUYRIE, P. The Structural Factor of Hypertension. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 1007–1021, 13 mar. 2015.

LAURENT, S. et al. Carotid Artery Distensibility and Distending Pressure in Hypertensive Humans. **Hypertension**, v. 23 (part 2), n. 878–883, 1994.

LAVIADES, C. et al. Abnormalities of the Extracellular Degradation of Collagen Type I in Essential Hypertension. **Circulation**, v. 98, n. 6, p. 535–540, 1998.

LAW, C.; SHIELL, A. **Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature.pdf**, 1996.

LAWLOR, D. A.; LICHTENSTEIN, P.; LANGSTROM, N. Association of maternal diabetes mellitus in pregnancy with offspring adiposity into early adulthood: sibling

study in a prospective cohort of 280,866 men from 248,293 families. **Circulation**, v. 123, p. 258–265, 2011.

LEE, R. M. K. W.; SMEDA, J. S. Primary versus secondary structural changes of the blood vessels in hypertension. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 392–401, 1985.

LEESON, C. P. M. et al. Impact of Low Birth Weight and Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Function in Early Adult Life. **Circulation**, v. 103, p. 1264–1269, 2001.

LEHOUX, S. et al. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. **Circulation**, v. 109, p. 1041–1047, 2004.

LEHOUX, S.; CASTIER, Y.; TEDGUI, A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 4, p. 381–392, 2006.

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

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132–142, 2003.

LEVER, A. F. et al. Slow developing pressor effect of angiotensin II and vascular structure. **Journal of Hypertension Suppl.** v. 11, n. 3, p. 27–28, 1993.

LEVY, B. I. et al. **Modifications of the arterial mechanical properties of normotensive and hypertensive rats without arterial pressure change**, 1989.

LEVY, B. I. et al. Impaired tissue perfusion a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. **Circulation**, v. 118, n. 9, p. 968–976, 2008.

LEVY, E. et al. The Epigenetic Machinery in Vascular Dysfunction and Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 6, p. 52, 2017.

LI, J. S. et al. Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 1 Pt 2, p. H88–93, 1996.

LIMA, M. C. B. DE M. et al. [The spatial inequality of low birth weight in Brazil]. **Ciencia & saude coletiva**, v. 18, n. 8, p. 2443–52, 2013.

LIU, N. Q. et al. Dietary vitamin D restriction in pregnant female mice is associated with maternal hypertension and altered placental and fetal development. **Endocrinology**, v. 154, n. 7, p. 2270–2280, 2013.

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

LUCAS, S. R. R. et al. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. **Pediatric Nephrology**, v. 11, n. 6, p. 719–723, 1997.

LUND-JOHANSEN, P. 1983. **Perlundjohansen.pdf**, 1983.

LYNCH, S. A.; WRIGHT, C. **Sirenomelia, limb reduction defects, cardiovascular malformation, renal agenesis in an infant born to a diabetic mother.**, 1997.

MACKIE, E. J. et al. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. **The American journal of pathology**, v. 141, n. 2, p. 377–88, ago. 1992.

MAGATON, A. et al. Maternal diabetes mellitus - Early consequences for the offspring. **Pediatric Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 37–43, 2007.

MAHMOUD, M. F. et al. Studies on the antidiabetic activities of Momordica charantia fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 758-765, 2017.

MANDERSON, J. et al. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. **Diabetologia**, v. 45, n. 7, p. 991–996, 2002.

MAREK, A. et al. TGF-beta (Transforming Growth Factor-Beta) in Chronic Inflammatory Conditions - A New Diagnostic and Prognostic Marker? v. 8, n. 7, p. RA145-151, 2002.

MARTIN, B. M. et al. Elastin synthesis and accumulation in irradiated smooth muscle cell cultures. **Connective Tissue Research**, v. 28, n. 3, p. 181–189, 1992.

MARTINEZ-LEMUS, L. A. et al. Integrins and regulation of the microcirculation: From arterioles to molecular studies using atomic force microscopy. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 99–112, 2005.

MARTINEZ-LEMUS, L. A.; HILL, M. A.; MEININGER, G. A. The Plastic Nature of the Vascular Wall: A Continuum of Remodeling Events Contributing to Control of Arteriolar Diameter and Structure. **Physiology**, v. 24, n. 1, p. 45–57, 2009.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 51-65, 2013.

MASSAGUÉ, J.; PANDIELLA, A. Membrane-anchored growth factors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 515-541, 1993.

MASLOVA, E. et al. Maternal protein intake in pregnancy and offspring metabolic health at age 9-16 y: Results from a Danish cohort of gestational diabetes mellitus pregnancies and controls. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. 2, p. 623–636, 2017.

MCFARLANE, S. I.; KUMAR, A.; SOWERS, J. R. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 12, p. 30–37, 2003.

MCGRATH, J. C. et al. New aspects of vascular remodelling : the involvement of all vascular cell types. p. 469–475, 2005.

MECHAM, R. P. et al. Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 116, n. 3, p. 282–288, 1983.

MENDEZ, J. D.; RAMOS, H.G. Animals models in diabetes research. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 4, p. 367-375, 1994.

MILLER, B. G. et al. Cell and wall morphology of intestinal arterioles from 4- to 6- and 17- to 19-week-old Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 9, n. 1, p. 59–68, 1987.

MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n.5, p. a021873, 2016.

MORTENSEN, O. H. et al. Developmental programming by high fructose decreases phosphorylation efficiency in aging offspring brain mitochondria, correlating with enhanced UCP5 expression. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 34, n. 7, p. 1205–1211, 2014.

MULVANY, M.; BAANDRUP, U.; GUNDERSEN, H. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. **Circulation Research**, v. 57, n. 5, p. 794–800, 1985.

MULVANY, M. J. Determinants of vascular hemodynamic characteristics. **Hypertension**, v. 6, n. (Pt 2), p.13-18, 1984.

MULVANY, M. J. Vascular remodelling of resistance vessels : can we define this ? v. 41, p. 9–13, 1999.

MULVANY, M. J. Relations between vascular structure and blood pressure. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 3, n. 3, p. 313-316, 1987.

MULVANY, M. J. Response of vascular smooth muscle to rapid load changes. **The Journal of Physiology**, v. 280, p. 28P-29P, 1978.

MULVANY, M. J. Small artery remodeling in hypertension. **Current hypertension reports**, v. 4, n. 1, p. 49–55, 2002.

MULVANY, M. J. Structural Abnormalities of the Resistance Vasculature in Hypertension. **Journal of Vascular Research**, v. 40, n. 6, p. 558–560, 2003.

MULVANY, M. J. et al. Vascular remodeling. **Hypertension**, v. 28, n. 3, p. 505-506, 1996.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 4, p. 921–961, 1990.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. **Annals of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 7–21, 2001.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 30, p. 21491–21494, 1999.

NEHIRI, T. et al. Exposure to Maternal Diabetes Induces Salt-Sensitive Hypertension and Impairs Renal Function in Adult Rat Offspring. **Diabetes**, v. 57, n. 8, p. 2167–2175, 2008.

NERENBERG, K.; DASKALOPOULOU, S. S.; DASGUPTA, K. Gestational diabetes and hypertensive disorders of pregnancy as vascular risk signals: an overview and grading of the evidence. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 30, n. 7, 765–773, 2014.

NOLD, J. L.; GEORGIEFF, M. K. Infants of diabetic mothers. **Pediatric Clinics of North America**, v. 51, n. 3, p. 619–637, 2004.

NØRRELUND, H. et al. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 24, n. 3, p. 301–308, 1994.

O'CONNELL, M. K. et al. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. **Matrix Biology**, v. 27, n. 3, p. 171–181, 2008.

OGALLA et al. Structural, mechanical and myogenic properties of small mesenteric arteries from ApoE KO mice: characterization and effects of virgin olive oil diets. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 1, p. 55-63, 2015.

OLIVEIRA V. L. L. et al. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rate with streptozotocin-induced diabetes treated with insulin. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 30, p. 1081-1086, 1997.

ONAL, I. K. et al. Serum levels of MMP-9 and TIMP-1 in primary hypertension and effect of antihypertensive treatment. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 369–372, 2009.

O'ROURKE, M. Mechanical principles in arterial disease. **Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 2-9, 1995.

OSMOND, C. et al. Early growth and death from cardiovascular disease in women. **BMJ**, v. 307, n. 6918, p. 1519–1524, 11 dez. 1993.

PAGE, K. A. et al. Gestational Diabetes Mellitus, Maternal Obesity, and Adiposity in Offspring. **The Journal of Pediatrics**, v. 164, n. 4, p. 807–810, 2014.

PARKS, W. C.; DEAK, S. B. Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 2, n. 5, p. 399–406, 1990.

PARVING, H.-H. et al. Hemodynamic factors in the genesis of diabetic microangiopathy. **Metabolism**, v. 32, n. 9, p. 943–949, 1983.

PASSMAN, J. N. et al. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 27, p. 9349–9354, 2008.

PASTERKAMP, G.; DE KLEIJN, D. P.; BORST, C. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 4, p. 843–52, 2000.

PENN, J. W.; GROBBELAAR, A. O.; ROLFE, K. J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review, v. 2, n. 1, p. 18-28, 2012.

PETTITT, D. J. et al. Association between maternal diabetes in utero and age at offspring's diagnosis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, n. 11, p. 2126–2130, 2008.

PINNEY, S. E.; SIMMONS, R. A. Metabolic Programming , Epigenetics , and Gestational Diabetes Mellitus. **Current Diabetes Reports**, v. 12, p. 67–74, 2012.

PLENZ, G. A. M. et al. Vascular collagens: Spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 1, p. 1–11, 2003.

PORTO, N. P. C. et al. Effects of K⁺Channels Inhibitors on the Cholinergic Relaxation of the Isolated Aorta of Adult Offspring Rats Exposed to Maternal Diabetes. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 118, n. 06, p. 360–363, 2010.

QIU, H. Y. et al. Mechanical and contractile properties of in situ localized mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 33(3):159-70, 1995.

RADENKOVIĆ, M. et al. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13-31, 2016.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 346–359, 2008.

RAMOS-ALVES, F. E. et al. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 7, p. 2198–2208, 2012a.

RAMOS-ALVES, F. E. et al. Increased Cyclooxygenase-2-Derived Prostanoids Contributes to the Hyperreactivity to Noradrenaline in Mesenteric Resistance Arteries from Offspring of Diabetic Rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50593, 2012b.

RAJÁGOPALAN, S. et al. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **J Clin Invest**, v. 98, n. 11, p. 2572–2579, 1996.

RENNA, N. F.; HERAS, N. DE; MIATELLO, R. M. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, 2013.

REY, F. E.; PAGANO, P. J. The reactive adventitia: Fibroblast oxidase in vascular function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 12, p. 1962–1971, 2002.

RHODIN, J. A. G. Architecture of the Vessel Wall. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 1–31, 1980.

RICH-EDWARDS, J. W. et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. v. 315, n. AUGUST, p. 396–400, 1997.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of cellular Development**, v. 11, p. 73–91, 1995.

RIZZONI, D. et al. Cellular Hypertrophy in Subcutaneous Small Arteries of Patients With Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 35, p. 931–935, 2000.

RIZZONI, D. et al. Structural Alterations in Subcutaneous Small Arteries of Normotensive and Hypertensive Patients With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 103, n. 9, p. 1238–1244, 2001a.

RIZZONI, D. et al. Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with

non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of hypertension**, v. 19, n. 5, p. 913–919, 2001b.

RIZZONI, D. et al. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. **Circulation**, v. 108, n. 18, p. 2230–2235, 2003a.

RIZZONI, D. et al. Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 3, p. 625–631, 2003b.

ROBERTS, A. B. Molecular and Cell Biology of TGF- β . **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 24, n. 2-3, p. 111-119, 1998.

ROCHA, S. O. et al. Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. **Pediatric Research**, v. 58, n. 6, p. 1274–1279, 2005.

ROSEI, E. A.; RIZZONI, D. Small artery remodelling in diabetes. v. 14, n. 5, p. 1030–1036, 2010.

ROSS, M. G. et al. Gestational Programming of Offspring Obesity: A Potential Contributor to Alzheimer ' s Disease. **Current Alzheimer Reasearch**, v. 4, p. 213–217, 2007.

RUCHAT, S. M.; HIVERT, M. F.; BOUCHARD, L. Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. SUPPL1, 2013.

SANTOS-ROCHA, J. et al. Maternal high-sodium intake affects the offspring' vascular renin-angiotensin system promoting endothelial dysfunction in rats. **Vascular Pharmacology**, p. 30407-5, 2019.

SCHAAN, B. D. et al. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**. v 37, n. 12, p. 1895-1902, 2004.

SCHIFFRIN, E. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 12, p. 1192–1200, 2004.

SCHIFFRIN, E. L. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with

structural changes. State of the art lecture. **Hypertension**, v. 19, n. 2_Suppl, p. II1-II1, 1992.

SCHIFFRIN, E. L. Structure and function of small arteries of essential hypertensive patients following chronic treatment with once-a-day nifedipine. **Cardiology**, v. 88 Suppl, n. 3, p. 20-26, 1997.

SCHIFFRIN, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 367–374, 2012.

SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 2, p. H435–H446, 2004.

SCHULZE-BAUER, C. A. J.; REGITNIG, P.; HOLZAPFEL, G. A. Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 6, p. H2427–H2440, 2002.

SCHWARTZ, S. M.; BENDITT, E. P. Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. **The American journal of pathology**, v. 66, n. 2, p. 241–64, 1972.

SEDEEK, M. et al. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 18, p. 122-127, 2009.

SEGAR, E. M. et al. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. **Clinical Science**, v. 117, n. 3, p. 129–138, 2009.

SELLERS, A.; WOESSNER JR, J. F. The extraction of a neutral metalloproteinase from the involuting rat uterus, and its action on cartilage proteoglycan. **The Biochemical journal**, v. 189, n. 3, p. 521–531, 1980.

SHARMA, M.; NAZARETH, I.; PETERSEN, I. Trends in incidence, prevalence and prescribing in type 2 diabetes mellitus between 2000 and 2013 in primary care: a retrospective cohort study, **BMJ Open**, v. 6, n. 1, p. e010210, 2016.

SHORE, A. C. et al. Impaired Microvascular Hyperaemic Response in Children with Diabetes Mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 8, n. 7, p. 619–623, 1991.

SILVA, M. C. Análise histológica e radiológica das alterações periodontais provocadas pela indução do diabetes em ratos, Dissertação, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2007.

SILVA, A. A. M. DA et al. The epidemiologic paradox of low birth weight in Brazil. **Revista de saude publica**, v. 44, n. 5, p. 767–75, 2010.

SILVA, V.; NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 1, 2015.

SIMEONI, U.; BARKER, D. J. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine Offspring of diabetic pregnancy: Long-term outcomes. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 119–124, 2009.

SONG, W.; ERGUL, A. Type-2 diabetes-induced changes in vascular extracellular matrix gene expression : Relation to vessel size. v. 7, p. 1–7, 2006.

SONOYAMA, K. et al. Vascular remodeling : implications for small artery function and target organ damage. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, p. 129–137, 2007.

SPIERS, J. P. et al. Alterations in vascular matrix metalloproteinase due to ageing and chronic hypertension: Effects of endothelin receptor blockade. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 9, p. 1717–1724, 2005.

STENMARK, K. R. Role of the Adventitia in Pulmonary Vascular Remodeling. **Physiology**, v. 21, n. 2, p. 134–145, 2006.

STOUFFER, G. A.; OWENS, G. K. TGF- β promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 5, p. 2048–2055, 1994.

STRAIN, W. D. et al. Differences in the association between type 2 diabetes and impaired microvascular function among Europeans and African Caribbeans. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2269–2277, 2005.

SURI, C. et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1171–1180, 1996.

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

SZOSTAK-WEGIEREK, D. Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. **International Journal of Women's Health**, v. 6, n. 1, p. 647, 2014.

TAIN, Y. L. et al. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the Offspring. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 357, 2017.

TANUS-SANTOS, J. E. et al. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. **Chest**, v. 118, n.1, p. 175-179, 2000.

TANUS-SANTOS, J. E. et al. The hemodynamic effects of endothelin receptor antagonism during a venous air infusion in dogs. **Anesthesia and Analgesia**, v. 90, n. 1, p. 102-106, 2000.

TORSNEY, E.; HU, Y.; XU, Q. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 2, p. 64–68, 2005.

TOUYZ, R. M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: Role of angiotensin II. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 4, p. 449–455, 2005.

TRASK, A. J. et al. Differential coronary resistance microvessel remodeling between type 1 and type 2 diabetic mice: impact of exercise training. **Vascular Pharmacology**, v. 57, n. 5-6, p. 187-193, 2012.

TRIGGLE, C. R.; LAHER, I. A review of changes in vascular smooth muscle functions in hypertension: isolated tissue versus in vivo studies. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 355–365, 1985.

TRIPATHI, V.; VERMA, J. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 29-32, 2014.

TUFIÑO, C. et al. Experimental gestational diabetes mellitus induces blunted vasoconstriction and functional changes in the rat aorta. **Biomed Research International**, v. 2004, p. 329634, 2014.

TUÑÓN, J.; RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Regulation of matrix proteins and impact on vascular structure. **Current hypertension reports**, v. 2, n. 1, p. 106–13, 2000.

UDALI, S. et al. Cardiovascular epigenetics: From DNA methylation to microRNAs. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 883–901, 2013.

VAN BORTEL, L. M. et al. Effects of antihypertensive agents on local arterial distensibility and compliance. **Hypertension**, v. 26, n. 3, p. 531-534, 1995.

VAN DEN STEEN et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 6, p. 375-536, 2002.

VAN HUYEN, J.-P. D. et al. In Utero Exposure to Maternal Diabetes Impairs Vascular Expression of Prostacyclin Receptor in Rat Offspring. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2597–2602, 2010.

VAN VARIK, B. J. et al. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 1–10, 2012.

VESSIÈRES, E. et al. Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed In Utero to Maternal Hyperglycaemia. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146830, 2016.

VINCENTI, M. P. The Matrix Metalloproteinase (MMP) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Genes: Transcriptional and Posttranscriptional Regulation, Signal Transduction and Cell-Type-Specific Expression. In: **Matrix Metalloproteinase Protocols**. New Jersey: Humana Press, v. 151, p. 121–148, 2001.

VIRDIS, A.; TADDEI, S. Endothelial Dysfunction in Resistance Arteries of Hypertensive Humans: Old and New Conspirators. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 451-457, 2016.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

VOS, L. E. et al. Birth Size and Coronary Heart Disease Risk Score in Young Adulthood . The Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) Study Author (s): L . E . Vos , A . Oren , M . L . Bots , W . H . M . Gorissen , D . E . Grobbee and C . S . P . M . Uiterwaal Publis. **European Journal of Epidemiology**, v. 21, n. 1, p. 33–38,

2006.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 3, p. 957–989, 2009.

WALKER-CAPRIOGLIO, H. M. et al. Organization of cells and extracellular matrix in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. **Cell and Tissue Research**, v. 269, n. 1, p. 141–149, 1992.

WALMSLEY, J. G.; OWEN, M. P.; BEVAN, J. A. Medial morphometry and mechanics of sequential rabbit ear arteries and myograph ring segments. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 245, n. 5, p. H840–H848, 1983.

WANG, M. et al. Matrix Metalloproteinase 2 Activation of Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1–Type II Receptor Signaling Within the Aged Arterial Wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 7, p. 1503–1509, 2006.

WANG, W.; KOKA, V.; LAN, H. Y. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. Review Article. **Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 48–56, 2005.

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. In: **Advances in Pharmacology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 81, p. 241–330, 2018.

WANG, Y. et al. The impact of a novel peach gum-derived polysaccharide on postprandial blood glucose control in streptozotocin-induced diabetic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 379–386, 2017.

WATTS, S. W. et al. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, p. H2438–H2448, 2007.

WAGENSEIL, J.E.; MECHAM, R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiology Review**, v. 89, n. 3, p. 957–989, 2009.

WICHI, R. B. et al. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 5, p. R1129–R1133, 2005.

WIGG, S. J. et al. Early vitamin E supplementation attenuates diabetes-associated vascular dysfunction and the rise in protein kinase C- β in mesenteric artery and ameliorates wall stiffness in femoral artery of Wistar rats. **Diabetologia**, v. 47, n. 6, p. 1038–1046, 2004.

WIGHT, T. N. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, n. 2, p. 4933–7, 2008.

WOLF, Y. G.; RASMUSSEN, L. M.; RUOSLAHTI, E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 3, p. 1172–1178, 1994.

WONG, L. C.; LANGILLE, B. L. Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. **Circulation Research**, v. 78, n. 5, p. 799-805, 1996.

WU, J.; YAN, L. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 8, p. 181, 2015.

XU, X. et al. A Glimpse of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Nephropathy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 28, p. 3244–3260, 2014.

XU, J.; SHI, G. P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 11, p. 2106–2119, 2014.

YABLUCHANSKIY, A. et al. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. **Physiology (Bethesda)**, v. 28, n. 6, p. 391-403, 2013.

YASMIN et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and Serum Elastase Activity Are Associated With Systolic Hypertension and Arterial Stiffness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 2, p. 372–378, 2005.

YESSOUFOU, A.; MOUTAIROU, K.; KHAN, N. A. A model of insulin resistance in mice, born to diabetic pregnancy, is associated with alterations of transcription-related genes in pancreas and epididymal adipose tissue. **Journal of Obesity**, 2011.

YIN, F. C. P.; TING, C.-T. Compliance changes in physiological and pathological

states. **Journal of Hypertension**, v. 10, n. Suppl 6, p. S31–S34, 1992.

YU, Q; STAMENKOVIC I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev**, v. 14:, p. 163–176, 2000.

YURCHENCO, P. D. Assembly of Basement Membranes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 580, n. 1, p. 195–213, 1990.

ZERVOUDAKI, A. et al. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. **Journal of Human Hypertension**, v. 17, n. 2, p. 119–124, 2003.

ZHANG, S. et al. Effects of troxerutin on cognitive deficits and glutamate cysteine ligase subunits in the hippocampus of streptozotocin-induced Type 1 diabetes mellitus rats. **Brain Research**, 2016.

ZIEMAN, S. J.; MELENOVSKY, V.; KASS, D. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 932–943, 2005.

ZIYADEH, F. N. et al. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor- β . **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 2, p. 536–542, 1994.