

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA SOBRE A PRESSÃO
ARTERIAL E A REATIVIDADE VASCULAR DA PROLE ADULTA**

Neciula de Paula Carneiro Porto

**Recife - PE
2008**

NECIULA DE PAULA CARNEIRO PORTO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DIABETES GESTACIONAL
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA SOBRE A PRESSÃO
ARTERIAL E A REATIVIDADE VASCULAR DA PROLE ADULTA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

ORIENTADORA:

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

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou

**Recife - PE
2008**

NECIULA DE PAULA CARNEIRO PORTO

Avaliação dos Efeitos do Diabetes Gestacional Induzido por
Estreptozotocina sobre a Pressão Arterial e a Reatividade Vascular
da Prole Adulta”

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

Aprovado por:

Jose Henrique LC

Fabiano Elias Xavier

SAULO GALVO

Paulo LB RIZZO

Data: 04 / 08 / 2008

Porto, Neciula de Paula Carneiro

Avaliação dos efeitos do diabetes gestacional induzido por estreptozotocina sobre a pressão arterial e reatividade vascular da prole adulta / Neciula de Paula Carneiro Porto. – Recife: O Autor, 2008.

97 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Farmacologia e Fisiologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes gestacional 2. Estreptozotocina 3. Aorta isolada 4. Pressão arterial. I Título.

618.364 6

CDU (2.ed.)

UFPE

618.

CDD (22.ed.)

CCB – 2009- 022

A **Deus**, por sua constante presença em cada momento da minha vida, fazendo-me caminhar além das minhas forças e presenteando-me com mais esta conquista.

A **Neci**, minha mainha, pelo exemplo de mulher lutadora e sonhadora que sempre me inspirou a perseverar e a realizar meus sonhos, e que a cada instante/atitude ensinou-me o sentido mais pleno da palavra Amor.

A **Felisberto** (*In Memoriam*), meu painho, apesar da sua ausência, as lembranças de suas palavras de incentivo e entusiasmo me fizeram persistir em momentos de crise e acreditar que posso ir além do que imagino. Você fez parte desta conquista. Saudades...

A **Paulinho**, meu noivo, a surpresa mais agradável de Deus nesta caminhada, que nos momentos de crise trouxe serenidade ao meu coração, compreensão e apoio em todas as horas, inclusive nas “maravilhosas” trocas de gaiola dos fins de semana.

Aos **Meus queridos irmãos e cunhadas, Joubert** (*In Memoriam*) e **Val, Necienne, Juninho e Julia** pela cumplicidade, incentivo, amizade e alegria da presença de vocês.

Meu amado Joubinho, saudades...

Aos **meus sobrinhos, Lucas e Gabriela** que mesmo sem perceberem trouxeram um sorriso aos meus lábios e a alegria da simplicidade da vida em momentos de estresse.

AGRADECIMENTOS

À **Profª Glória Isolina Pinto Duarte**, pela oportunidade de ser sua orientanda e por todo conhecimento e dedicação dispensados. Minha gratidão.

Ao **Prof. Saad Lahlou**, pelo incentivo constante e por ser um exemplo de pesquisador.

Ao **Prof. Pedro Magalhães**, pela disponibilidade de abrir o seu laboratório para fazermos os experimentos de aorta e pelo entusiasmo contagiante em realizar pesquisa e concretizar projetos.

À **Profa. Cristina de Oliveira**, pelo incentivo e imprescindível colaboração nos experimentos.

Aos **colegas do Laboratório**, Érika Siqueira, Conceição Matoso, Leillyane de Andrade, Rodrigo Siqueira, Tatiana Siqueira, David Carvalho, Sérgio Calisto, Carlos Correia Junior, Stefânia Santos, Thuanny Saraiva, Odair Alves, Manoela Fernandes, pelo companheirismo e ajuda durante os experimentos.

Aos **colegas do Mestrado**, Fernanda Soares, Leonardo Castro, Erica Uchoa, Thayse Neves, Priscila Passos, Thais de Assis, Carine Wiesiolek, Helane Santos, Izabel Barreto, Leillyane de Andrade, e, em especial, a Érika Nóbrega e Juliany Braglia, pelo incentivo, amizade e por tornar mais leve essa caminhada acadêmica.

Aos **funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia** em especial a **Sra Edilene Menezes, Sr. Márcio Pires, Sr. Edvaldo Mendes e Sra. Sônia Reis** por toda a atenção.

A **todos os professores** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica.

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

Ao Veterinário, Sr. **Waldo Oliveira Filho**, pelo apoio no acompanhamento dos animais diabéticos.

À técnica, Sra. **Rejane de Souza**, pela disponibilidade de nos auxiliar sempre que necessário com a técnica da coleta de sangue pelo plexo orbital.

Apoio financeiro: CNPq (projeto Casadinho), FACEPE - CNPq/Pronex.

RESUMO

Diabetes gestacional pode ter conseqüências deletérias na função cardiovascular da prole adulta. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do diabetes gestacional sobre a pressão arterial média (PAM) e a reatividade vascular. Para isto, o diabetes gestacional foi induzido no sétimo dia de gestação com uma única dose estreptozotocina (42 mg/kg, i.p.) dissolvida em tampão citrato (0,01M; pH 4,5). Fêmeas controle receberam apenas tampão. A prole foi dividida em dois grupos: controle, não diabético (ND) e diabetes gestacional (DG). O peso corporal (PC) ao nascimento foi menor no grupo DG, mantendo-se reduzido durante toda vida. Aos 4 meses de idade nenhuma diferença foi observada na PAM (116 ± 12 , ND vs. 123 ± 11 mmHg, DG) e frequência cardíaca (381 ± 33 , DG vs. 373 ± 28 b.p.m., ND) em ratos acordados. A relação peso do coração seco / PC não foi alterada no grupo DG. Em preparações de aorta com endotélio íntegro oriundos do grupo DG, a resposta contrátil à norepinefrina (NE), mas não ao cloreto de potássio (KCl), foi aumentada ($453,0 \pm 43,4$ mg) quando comparada ao ND ($325,8 \pm 35,2$ mg). Adicionalmente, a resposta vasorrelaxante para acetilcolina (Ach) foi reduzida em DG. Este efeito parece estar associado à redução da atividade do canal K_{ATP} . Não foi observado alteração nos níveis de colesterol do grupo DG, mas os níveis de triglicerídeos foram elevados ($p < 0,001$) quando comparados ao ND. Nosso estudo mostrou que diabetes durante a gestação afeta a função vascular, mas não induz obrigatoriamente a hipertensão.

Palavras – chaves: Diabetes gestacional. Estreptozotocina. Aorta isolada. Pressão arterial.

ABSTRACT

Vascular disease is a major cause of mortality and morbidity in chronic diabetes mellitus (DM). To characterize the nature of the vascular changes occurring in diabetes, many studies have been conducted in animal models with chemically-induced diabetes. However, long-term impact of maternal diabetes (MD) on vascular function in the offspring is poorly investigated. Therefore, the present study was designed to examine the alterations produced by MD in K^+_{ATP} channels activity on endothelium-dependent aortic relaxation induced by acetylcholine (ACh) in adult offspring rats. Additionally, this study also assessed the impact of MD on baseline blood pressure and heart rate in the adult offspring. DM was induced in female Wistar rats with a single dose of streptozotocin (STZ; 42 mg/kg, i.p.) on the 7th day of pregnancy. Control animals only received STZ vehicle. Body weights of offspring rats from diabetic mothers (ODR) were significantly lesser than those of offspring rats from control mothers (OCR). At 120 days of age, neither baseline blood pressure nor heart rate was different between ODR and OCR. However, triglyceride but not glucose and cholesterol level was significantly higher in ODR than in OCR. In aortic preparations from ODR, norepinephrine (NE)-induced contractions were significantly higher than those observed in OCR, whereas contractile responses to KCl (60 mM) did not differ between the two groups. In aortic preparations from ODR precontracted with NE (1 μ M), vasorelaxant response to ACh at 0.1 nM (expressed as % of the vasorelaxant response to the higher concentration used of ACh, 10 nM), but to the endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium nitroprusside (0.1 nM), were slightly and significantly reduced when compared to OCR. In both groups, vasorelaxant responses to ACh was reduced in the presence of K^+ channel modulators such as tetraethylammonium chloride (TEA, 5 mM), 4-aminopyridine (4-AP, 3 mM) or diazoxide (0.1 mM). However, pretreatment with glybenclamide (10 μ M), an ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) inhibitor, was able to reduce vasorelaxant effects of ACh only in preparations from OCR. Our results suggest that a reduction in K^+_{ATP} activity contributes to the decreased efficacy of ACh to relax *in vitro* aortae from adult offspring of STZ-diabetic mothers.

Key-words: Gestational diabetes. Streptozotocin. Aortic isolated. Blood pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura anatômica do pâncreas	22
Figura 2 - Macroangiopatia diabética: patogêneses e fisiopatologia	27
Figura 3 - Organização aparente do cito-esqueleto e miofilamentos do músculo liso.	29
Figura 4 - Proteína G (α , β e γ) ligada ao receptor com sete domínios transmembranais	29
Figura 5 - Regulação do tônus vascular através da via do NO / cGMP. NO- óxido nítrico, cGMP - 3'5'- guanosina monofosfato cíclico	32
Figura 6 - Interação protéica regulando a NOS endotelial na caveola	33
Figura 7 - Relação entre a caveolina e o oxido nítrico (NO) dependente do endotélio	35
Figura 8 - Canais para potássio e o tônus vascular	37
Figura 9 - Esquema do efeito da programação fetal em um ambiente comprometido	41
Figura 10 - Esquema simplificado do <i>set up</i> utilizado nos experimentos de aorta	50
Figura 11- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (1mM) em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contráídos com NE (1 μ M)	51
Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (1mM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com TEA e pré-contráídos com NE (1 μ M)	52
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (1mM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com glibenclamida e pré-contráídos com NE (1 μ M)	52
Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (1mM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com 4-AP e pré-contráídos com NE (1 μ M).	53
Figura 15 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (1mM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com diazóxido e pré-contráídos com NE (1 μ M)	53

Figura 16 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante do NPS (1mM) em preparações de anéis de aorta torácica de ratos, pré-contraídos com NE (1μM)	54
Figura 17 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta alfa-adrenérgica em preparações de anéis de aorta isolada de rato através da curva concentração-resposta para a NE (1nM – 1000nM)	55
Figura 18 - Consumo diário de água e ração de ratas diabéticas (DG, colunas brancas) e ratas não diabéticas (ND, colunas negras) após 7 dias de parição	57
Figura 19 - Peso corporal da prole de ratas diabéticas (DG, colunas brancas) e ratas não diabéticas (ND, colunas negras), ao nascimento	58
Figura 20 - Efeitos do diabetes gestacional sobre o curso temporal do peso corporal da prole da 6ª semana após o nascimento até 15ª semana	58
Figura 21 - Contração induzida por 60 mM de K ⁺ e por 1μM de NE em anéis de aorta torácica oriundos da prole de ratas com diabetes gestacional (DG, colunas brancas) (n = 24) e não diabéticas (ND, colunas negras) (n = 20)	61
Figura 22 - Curva concentração-efeito da norepinefrina (1-1000nM) induzindo contração em anéis de aorta torácica com endotélio da prole adulta oriunda de mães com diabetes gestacional (●) e mães não diabéticas (○)	62
Figura 23 - Concentração-resposta da Acetilcolina (ACh, 0,1 a 10 μM) em preparações de aorta, obtidas da prole adulta de ratas não diabéticas (ND, colunas negras) e de ratas com diabetes gestacional (DG, colunas brancas), pré-contraídas com norepinefrina (NE, 1μM)	62
Figura 24 - Concentração resposta da acetilcolina (ACh) induzindo relaxamento sobre preparações de anéis de aorta, obtidas da prole de ratas com diabetes gestacional (colunas brancas) e não diabéticas (colunas pretas), pré-contraídas com norepinefrina (NE)	63
Figura 25 - Efeito concentração-resposta de nitroprussiato de sódio (NPS) sobre preparações de aorta sem endotélio, obtidas da prole de ratas submetidas ao diabetes gestacional (colunas brancas) e ratas não diabéticas (colunas negras), pré-contraídas com norepinefrina (1μM)	64
Figura 26 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (ACh) em anéis de aorta pré-tratados com o bloqueador tetraetilamônio (TEA, 5mM), oriundos da prole de ratas não diabéticas (ND) (painel A) e de ratas submetidas ao diabetes gestacional (DG) (painel B)	65

Figura 27 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (Ach) em anéis de aorta pré-tratados com o bloqueador 4-aminopiridina (4-AP, 3 mM), oriundos da prole de ratos submetidos ao diabetes gestacional (DG) (parte inferior) e ratos não diabéticos (ND) (parte superior) 66

Figura 28 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (Ach) em anéis de aorta pré-tratados com glibenclamida (10 μ M), oriundos da prole de ratas não diabéticas (ND) (painel A) e ratos submetidos ao diabetes gestacional (DG) (parte inferior) 68

Figura 29 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (Ach) em preparações de anéis de aorta pré-tratadas com diazóxido, oriundos da prole de ratos submetidos ao diabetes gestacional (DG) (parte inferior) e ratos não diabéticos (ND) (parte superior) 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças fundamentais entre o diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2)	20
Tabela 2 - Comparação entre os parâmetros anatômicos da prole adulta de animais submetidos ao diabetes gestacional (DG) e a prole de animais não diabéticos (ND)	59
Tabela 3 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos da prole adulta de animais oriundos de fêmeas com diabetes gestacional (DG) induzido por estreptozotocina (STZ, 42 mg/kg i. p.) e de fêmeas não diabéticas (ND)	59
Tabela 4 - Comparação dos níveis de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) entre fêmeas (mães) com diabetes gestacional (DG) induzido por estreptozotocina (42 mg/kg, i.p.) e não diabéticas (ND), bem como suas proles adultas.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach = Acetilcolina
AC = Adenilato ciclase
ADA = Associação Americana de Diabetes
AGE = Produtos avançados de glicação
AMPc = Adenosina monofosfato cíclico
ANG II = Angiotensina II
ANOVA = Análise de variância
4-AP = 4-aminopiridina
ATP = Adenosina trifosfato
RNA= Ácido ribonucleico
($[Ca^{2+}]_i$) = Concentração de cálcio intracelular
cav-1 = Caveolina-1
cav-2 = Caveolina-2
CLM = Cadeia leve de miosina
CRP = Proteína C reativa
COX = Ciclooxigenase
DM = Diabetes mellitus
E = Epinefrina
ECA = Enzima conversora da angiotensina
ET-1 = Endotelina-1
EDHF = Fator de hiperpolarização derivado de endotélio
EDRF = Fator relaxante derivado do endotélio
EGF = Fator de crescimento epidérmico
Emax = Efeito máximo
Em = Potencial de membrana
eNOS = Óxido nítrico síntase endotelial
FAN = Fator atrial natriurético
FC = Frequência cardíaca
FEN = Fenilefrina
FLCM = Fosfatase de cadeia leve de miosina
GlcNAc = N-acetilglucosamina

GMPC = Guanosina monofosfato
GPCRs = Receptores acoplados a proteínas G
HbA1c = Hemoglobina A1c
HDL = Lipoproteína de alta densidade
IL-6 = Interleucina-6
i.p. = Intraperitoneal
IP3 = Inositol trifosfato
IR = Receptor para insulina
 K_{IR} = Canais retificadores de potássio
LDL = Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME = Metiléster de L-arginina
mg/dL = Miligrama por decilitro
MLCK = Miosina quinase da cadeia leve
ML = Músculo liso
mL = Mililitro
MLV = Músculo liso vascular
mmol/L = Milimol por litro
mM = Milimolar
NA = Noradrenalina
 Na^+/K^+ ATPase = Sódio potássio atpase
NO = Óxido nítrico
NOS = Óxido nítrico sintetase
iNOS = Óxido nítrico sintetase induzível
nNOS = Óxido nítrico sintetase neuronal
NPS = Nitroprusiato de sódio
PA = Pressão arterial
PAD = Pressão arterial diastólica
PAI-1 = Inibidor de ativação de plasminogênio-1
PAM = Pressão arterial média
PAS = Pressão arterial sistólica
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaqueta
PG = Prostaglandina
 PGI_2 = Prostaciclina
PKC = Proteína quinase C

PKG = Proteína quinase G

PLC = Fosfolipase C

RI = Resistência insulínica

ROCs = Canais operados por receptor

r.p.m. = Rotação por minuto

RS = Retículo sarcoplasmático

RYR = Receptor para rianodina

s.e.m. = Erro padrão da média

SNC = Sistema nervoso central

STZ = Estreptozotocina

SUR = Unidade receptora de sulfoniluréia

TEA = Tetraetilamônio

TGF = Fator de crescimento tumoral

TXA2 = Tromboxano A2

UI/mL = unidades internacionais por mililitro

VIP = Peptídeo intestinal vasoativo

VOCs = Canais de Ca^{2+} operados por voltagem

VSMC = Células de músculo liso vascular

μM = Micromolar

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	18
1. Generalidades	18
2. Endotélio e regulação do tônus vascular	26
3. Canais para potássio	36
4. Diabetes e Programação fetal	40
5. Diabetes experimental	43
II - OBJETIVOS	46
1. Geral	46
2. Específicos	46
III - MATERIAIS E MÉTODOS	47
1. Animais	47
2. Drogas utilizadas	47
3. Curva de crescimento ponderal	48
4. Consumo alimentar e hídrico	48
5. Determinação dos parâmetros bioquímicos	48
6. Determinação da PAM e FC da prole adulta de animais submetidos ao diabetes gestacional	49
6.1. Sistema de registro	49
7. Preparação da aorta isolada	49
8. Efeitos do diabetes gestacional sobre os parâmetros anatômicos do coração	55
9. Análise Estatística	55
IV - RESULTADOS	56
1. Efeitos do tratamento com estreptozotocina sobre a ingestão de água e ração em ratas prenhes	56
2. Efeitos do diabetes gestacional sobre o crescimento ponderal e os parâmetros anatômicos do coração da prole adulta	57
3. Efeitos do diabetes gestacional sobre as taxas plasmáticas de glicose, triglicérides, colesterol total e colesterol HDL da prole adulta	59
4. Efeitos do diabetes gestacional sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca	60

5. Efeitos do diabetes gestacional sobre a reatividade vascular da prole	60
V - DISCUSSÃO	70
VI - CONCLUSÕES	76
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

I - INTRODUÇÃO

1. Generalidades

O Diabetes Mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas (SBD, 2002), além de complicações vasculares (DE VRIESE et al., 2000). No mundo, a prevalência do diabetes em adultos é estimada para o ano 2025 como 135 milhões de pessoas, o que revela um importante problema de saúde pública. Entre os indivíduos com diabetes diagnosticada 90 a 95% têm diabetes tipo 2 (SCWARTZ, 2006).

A Associação Americana de Diabetes (ADA) classifica o diabetes em quatro grandes tipos (McCANCE et al., 1997; Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1997):

- diabetes tipo 1 (conhecido no passado como insulino-dependente);
- diabetes tipo 2 (conhecida como não insulino-dependente);
- outros tipos de diabetes (endocrinopatias, causada por infecções, drogas, defeitos genéticos na função das células beta do pâncreas, etc.);
- diabetes gestacional;
- alteração do metabolismo ou da homeostase da glicose.

Outros critérios para definir o diabetes foram propostos pela ADA e levam em consideração estudos epidemiológicos que permitiram relacionar os níveis de glicemia e o risco de desenvolvimento de complicações vasculares classificadas em microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia) e macrovasculares (isquemia cardíaca, doenças cerebrovascular e vascular periférica) (JARRETT; KEEN, 1976; FULLER et al., 1980 ; ESCHWEGE et al., 1985; PETTIT et al., 1990; GUILLAUSSÉAU et al., 1998; RAHMAN et al., 2007).

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas e pela cetoacidose. Abrange também associações com doenças auto-imunes (doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, anemia perniciosa, miastenia grave, etc.) e casos em que a destruição das células beta não é conhecida (WHO, 1999). O diabetes Mellitus do

tipo 2 (DM2) é caracterizado por dois tipos de anomalias: redução na secreção de insulina e resistência insulínica (RI). É uma doença que envolve fatores genéticos e ambientais (GUILLAUSSÉAU et al., 1997). As formas monogênicas ligadas a uma mutação sobre um gene são descritas como a origem da maior parte dos casos de insulinopenia como no diabetes tipo MODY, representando 5% de todos os tipos de DM2 e parecendo ser independente dos fatores ambientais (BYRNE et al., 1994; BYRNE et al., 1995; BYRNE et al., 1996). Os dados são mais complexos para a maioria das formas comuns de DM2, pois parece estar ligada à ação de fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais, o aporte alimentar energético elevado em gorduras e a redução do gasto energético pela redução de exercício físico, levam ao aumento de peso e determinam obesidade que, associada ao sedentarismo, é a origem da redução da ação da insulina sobre os tecidos alvos, principalmente músculo esquelético e tecido adiposo (resistência insulínica).

O efeito deletério do ambiente é observado principalmente em pacientes portadores de mutações em genes de proteínas envolvidas na regulação energética (receptor β_3 -adrenérgico, por exemplo) (PROCHAZKA et al., 1993; CLEMENT et al., 1995; WALSTON et al., 1995; FUJISAWA et al., 1996). A RI é insuficiente para desenvolver *per se* alterações na regulação da glicose. Face ao aumento das necessidades, as células beta-pancreáticas normais respondem com uma majoração da produção de insulina que pode chegar de três a quatro vezes mais que em uma pessoa normal. É o caso da grande maioria dos obesos onde a glicoregulação permanece normal.

A alteração na secreção de insulina caracteriza o DM2 e é responsável pelas alterações da glicoregulação (POLONSKY et al., 1996). Entretanto, os mecanismos que levam à deterioração progressiva da secreção de insulina nos pacientes portadores deste tipo de diabetes não são bem esclarecidos, embora, dados experimentais sugiram que a glicotoxicidade é a chave nesse processo (GJESSING et al., 1992). O caráter irreversível dos efeitos da glicotoxicidade poderia estar ligado à glicação de proteínas implicadas na regulação da secreção de insulina. Portanto, um controle metuculoso e precoce da hiperglicemia permitiria evitar a microangiopatia e o agravamento do déficit de insulina. Os sintomas do DM2 são mais brandos do que os do tipo 1 (Tabela 1) e, segundo Teixeira et al. (2001), grande parte dos portadores de DM2 são assintomáticos ou oligossintomáticos, levando a um diagnóstico tardio da doença, que é estimado como pelo menos de quatro a sete anos.

Tabela 1 – Diferenças fundamentais entre o diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2). Adaptado de McCance et al. (1997).

	DM1	DM2
Sexo	Homem = mulher	Mulher > Homem
Idade de diagnóstico	< 30 anos	> 40 anos
Aparecimento dos sintomas	Brusco	Insidioso
Peso	Sem obesidade	Obesidade (80%)
Período de remissão	Às vezes	Raro
Propensão a cetoacidose	Sim	Não
Tratamento com insulina	Indispensável	Desnecessário
Herança	Coincidência em gêmeos idênticos (40 - 50%)	Coincidência em gêmeos idênticos (90%)
Genética	Associada aos cromossomos 6 e 11	Polimorfismo genético no gene da insulina
Anticorpos	85 - 90%	Não
Imunidade celular antipancreática	Sim	Não
Etiologia viral	Possível	Não
Insulinite inicial	50 - 75%	Não
Endocrinopatias múltiplas associadas	Sim	Não
Nível de insulinemia	Diminuído ou nulo	Variável

O diabetes gestacional (DG) é definido como uma intolerância à glicose que começa ou é diagnosticada durante a gravidez (ACOG, 2001). Segundo Shaat et al. (2007), cerca de 2 a 5% de todas as mulheres grávidas desenvolvem o DG, a prevalência cresceu consideravelmente na última década. Estas mulheres são mais susceptíveis ao aborto e a desenvolver fetos com anomalias congênitas do que mulheres não diabéticas, bem como uma maior mortalidade perinatal e morbidade dos que sobrevivem (XIANG, 1999; DAMASCENO et al., 2002).

O DG, assim como o DM2, é associado à RI e à disfunção da secreção de insulina (RYAN et al., 1985; KUHL et al., 1991; CATALANO et al., 1993). As malformações causadas pelo diabetes são do tipo poligênico, multifatorial e sua causa exata continua desconhecida. Todos os órgãos e sistemas podem ser comprometidos, entretanto, o sistema cardiovascular e o tubo neural são os locais mais freqüentes de anomalias encontradas em filhos de mães diabéticas (PEDERSEN, 1965; CHO, 2001).

Existe uma correlação clara entre o grau do controle glicêmico e a ocorrência de complicações gestacionais. A macrosomia fetal, por exemplo, uma causa importante de morbidade e mortalidade perinatal, é uma complicação muito freqüente na grávida diabética (LEPERCQ et al., 2001; JOVANOVIC, 2001). Nas primeiras horas de vida, os recém-nascidos de mães diabéticas são mais hipoglicêmicos que os de mães não-diabéticas e possuem uma resposta insulínica mais intensa e mais rápida. Além disso, apresentam um nível mais baixo de ácidos graxos não esterificados, o que sugere rápida utilização dos mesmos para a conservação dos depósitos de glicogênio, importantes no uso dos sistemas dependentes de insulina. O hiperinsulismo fetal pode estar associado com a hipóxia fetal, embora isto ainda não foi comprovado, podendo levar a policitemia e hiperviscosidade sanguínea (LEITER, 2005).

A exposição prolongada à hiperglicemia é reconhecida como o fator causal primário na patogênese das complicações do diabetes (LAAKSO et al., 1999; GRUNDY et al., 1999), induzindo um grande número de alterações vasculares que aceleram a aterosclerose (ARONSON; RAYFIELD, 2002). Os efeitos da hiperglicemia geralmente são irreversíveis e levam à disfunção celular progressiva, apesar de não estar esclarecido o mecanismo, acredita-se que a perturbação celular persiste mesmo quando há um retorno a normoglicemia (FIORETTO et al., 1998). Além de promover estresse oxidativo, a hiperglicemia tem participação no mecanismo da aterosclerose, induzindo a produção de produtos avançados de glicação e a ativação da proteína quinase C (PKC) (NISHIKAWA et al., 2000).

É bem conhecido que o órgão implicado no desenvolvimento do diabetes é o pâncreas, especificamente as ilhotas de Langerhans. O pâncreas tem funções fisiológicas bastante diferenciadas: os ácinos (pâncreas exócrino) são responsáveis pela secreção dos sucos digestivos no duodeno; as ilhotas de Langerhans (pâncreas endócrino) são responsáveis pela secreção da insulina e peptídeo C (células β), glucagon (células α), somatostatina (células γ) e de um hormônio denominado polipeptídio pancreático (células PP) (Figura 1).

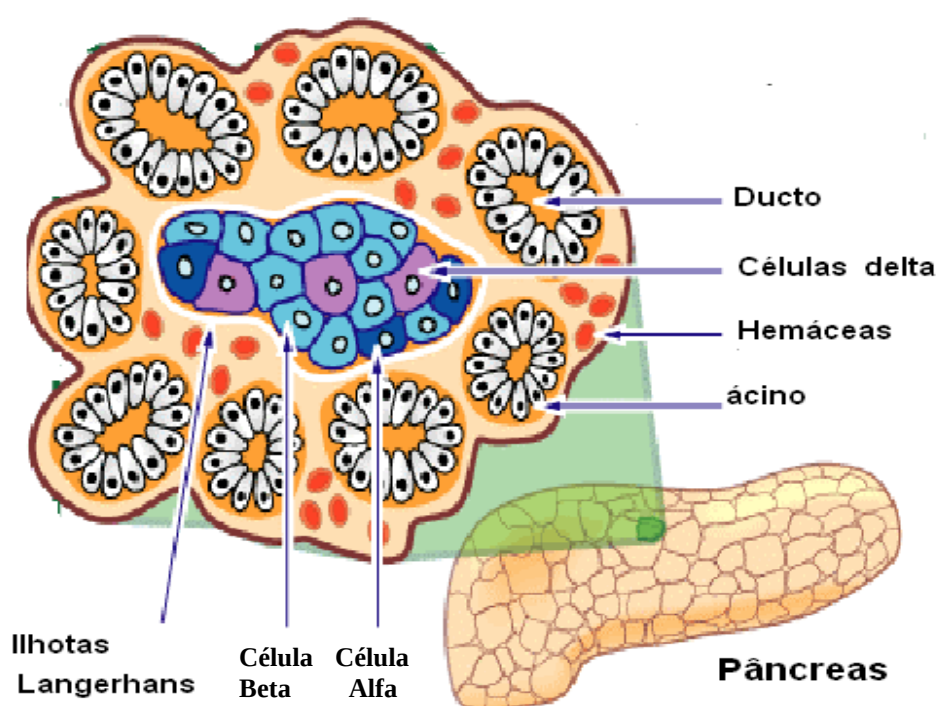


Figura 1- Estrutura anatômica do pâncreas.

Fonte: Guyton e Hall (2006), adaptado.

O controle da glicemia depende de uma regulação apropriada da insulina. Em condições normais, ela regula a produção de glicose hepática e estimula a captação de glicose para os tecidos periféricos, o que não ocorre no DM2 e em certas formas de obesidade. Portanto, sem dúvida, a descoberta da insulina mudou radicalmente o prognóstico dos pacientes diabéticos que estavam destinados ao óbito e que passaram a viver de maneira normal, embora a administração de insulina evite a morte, mas produza complicações a longo prazo. Estas complicações afetam vários órgãos, o metabolismo de glicídios, lipídeos e

protídeos, além de sistemas de neurotransmissão, originando quadros patológicos de grande importância.

A insulina age através de uma subfamília do receptor tirosina quinase, cujos membros mais importantes são o receptor para insulina (IR) e o receptor para o fator de crescimento da insulina I (IGF-IR) (ULLRICH et al., 1986). A hiperinsulinemia pode ativar a IGF-I promovendo crescimento e divisão celular das células do músculo liso vascular, exercendo um potencial aterogênico importante (UTRIAINEN et al., 1998).

Estima-se que 40% dos diabéticos do tipo 1 e 2 apresentam algum tipo de alteração neuropática no momento do diagnóstico, sendo afetados tanto os nervos sensoriais como motores ou autonômicos. Sua prevalência aumenta com a evolução da doença e com a idade do paciente. Essa afecção leva ao mau funcionamento do sistema enzimático da aldoreductase provocando, a longo prazo, defeitos na transmissão do impulso nervoso. Em vários casos, provoca desmielinização das fibras nervosas, que parece ser a causa principal das neuralgias do diabetes. É bem conhecido que as complicações crônicas microvasculares do diabetes ocorrem tardiamente e estão associadas a anormalidades estruturais dos nervos, rins, retina e vasos, além da falta de controle dos níveis glicêmicos. Em indivíduos assintomáticos, foi observado que até 20% apresentava prejuízo da função autonômica cardiovascular, sendo esta a forma mais estudada e clinicamente mais importante dentre as neuropatias diabéticas (BOULTON et al., 2005). Alguns estudos demonstraram que a disfunção autonômica cardiovascular, medida através da variabilidade da frequência cardíaca (FC), está associada ao aumento do risco (duas vezes maior) de isquemia miocárdica silenciosa e mortalidade em pacientes com DM2 (EWING et al., 1995; SAWICKI et al., 1998).

A associação entre DM e doença cardiovascular, bem como morbidade e mortalidade, é bem estabelecida, sendo as doenças cardiovasculares responsáveis por mais de 75% das hospitalizações e por 80% da mortalidade de pacientes diabéticos (KANNEL; MCGEE, 1979; LAAKSO, 1997; ARONSON; RAYFIELD, 2002; CHANG et al., 2006), cujas causas principais são as alterações hematológicas e cardiovasculares. Os fatores de risco tradicionais para as doenças da artéria coronariana incluem diabetes, hipercolesterolemia e hipertensão, os quais também estão associados à disfunção do endotélio e promoção do processo aterogênico.

No diabetes, os leucócitos têm uma atividade mitogênica e fagocitária reduzida, observando-se um aumento na destruição de glóbulos vermelhos. As proteínas plasmáticas sofrem glicosilação, tornando o sangue mais viscoso, o que aumenta o risco de trombos. As plaquetas têm um papel chave na formação de trombos e anormalidades em sua função podem

aumentar a progressão da aterosclerose. Pacientes com diabetes apresentam aumento da reatividade plaquetária, ocorrendo redução da fluidez da membrana, alteração do fluxo de cálcio e magnésio, aumento da liberação de fatores intra-plaquetários, como tromboxano A₂ (TXA₂) e serotonina (HODGSON et al., 1992; JAMES; HODGSON, 1995), redução da síntese de prostaciclina e óxido nítrico (COLWELL; NESTO, 2003). As alterações cardiovasculares podem ser observadas nos grandes vasos (macroangiopatias) ou em pequenos vasos (microangiopatias) e envolvem alterações no metabolismo do ácido araquidônico, na permeabilidade e na sensibilidade (HODGSON et al., 1990; RAHMAN et al., 2006).

Entre as microangiopatias mais frequentes destaca-se a nefropatia diabética, manifestada por glomeruloesclerose que evolui para insuficiência renal. O DM é o responsável por 30% das insuficiências renais graves que necessitam de diálise e 16% de transplante renal. A evolução da nefropatia diabética é manifestada por microalbuminúria seguida de proteinúria e de uremia que leva à insuficiência renal terminal. O aparecimento da proteinúria está precedido de hiperfiltração glomerular, vasodilatação renal e aumento da permeabilidade capilar as macromoléculas (COOPER et al., 2001).

As alterações oculares afetam os nervos oculomotor e óptico, sendo a retina a estrutura mais afetada. A retinopatia diabética é a causa mais frequente de cegueira (SOBREVIA; MANN, 1997).

As macroangiopatias estão associadas com alterações da estrutura e função dos vasos, reduzindo a complacência e levando à hipertensão. As mudanças estruturais são conseqüentes da glicação de componentes da parede e alteração funcional originada da disfunção endotelial, aumentando a velocidade de pulso e a amplitude, que levam ao aumento da pressão sistólica, promovendo assim o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda, um importante fator de risco cardiovascular (JONHSTONE et al., 1993, COOPER et al., 2001; RAHMAN et al., 2006). Vários estudos demonstraram que o DM causa disfunção do miocárdio por acelerar a doença arterial coronariana aterosclerótica e a hipertensão (ABACI et al., 1999; MERCADO et al., 2001; POORNIMA et al., 2006). Um dos fatores críticos e muitas vezes responsável pelo desenvolvimento das doenças vasculares no diabético é o endotélio, ou melhor, a perda da sua capacidade de regular o tônus vascular com alteração na capacidade de vasodilatação (JONHSTONE et al., 1993; FELETOU et al., 1994; PIEPER et al., 1997).

Recentemente, a RI na ausência de diabetes ou de síndrome metabólica, foi associada à disfunção endotelial (CARVALHO et al., 2006). Esta associação sugere que o processo aterosclerótico pode iniciar a RI e levar à progressão da síndrome metabólica para o pré-

diabetes, e em seguida para o DM2. Todos os componentes da síndrome metabólica induzem disfunção endotelial, que se manifesta de várias maneiras, como alteração dos mediadores da vasodilatação, redução da expressão de ativadores teciduais do plasminogênio e aumento de substâncias pró-coagulantes que contribuirão para início da doença aterosclerótica. Assim, as lesões do endotélio causam disfunção endotelial com alteração da liberação de ON e perda da proteção anti-aterogênica (WHEATCROFT et al., 2003; CARVALHO et al., 2006).

Em geral, a disfunção endotelial prediz eventos cardiovasculares. A dislipidemia, por exemplo, é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular em pacientes diabéticos (LEHTO et al., 1997). Na população diabética, as alterações lipídicas mais frequentes são a hipertrigliceridemia, HDL-colesterol (HDL-c) baixo, alterações qualitativas nas lipoproteínas como a formação de partículas de LDL-colesterol (LDL-c), pequenas e densas (Figura 2).

O metabolismo de colesterol é regulado e influenciado pela ingestão alimentar, hormônios tireoideanos, estrógenos, beta-endorfinas e insulina. Esta última possui importante papel na síntese endógena de colesterol, sendo a sua principal moduladora (MARINETTI, 1990). A hipercolesterolemia pode ter origem multifatorial, caracterizando-se por defeitos do metabolismo de lipoproteínas e constituindo-se um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (LURIE et al., 1985; MOKLER et al., 1985; GRUNDY; BEARN, 1988; MARINETTI, 1990; RUBATTU et al., 1993; WALD; LAW, 1995; DANEV et al., 1997) por promover alterações na contratilidade cardíaca e na resposta vascular (MOKLER et al., 1985). Alteração nesta resposta vascular foi demonstrado através de artérias femorais isoladas e perfundidas com plasma hipercolesterolêmico que apresentavam um aumento da resposta vasoconstrictora a NE (BLOOM, 1975).

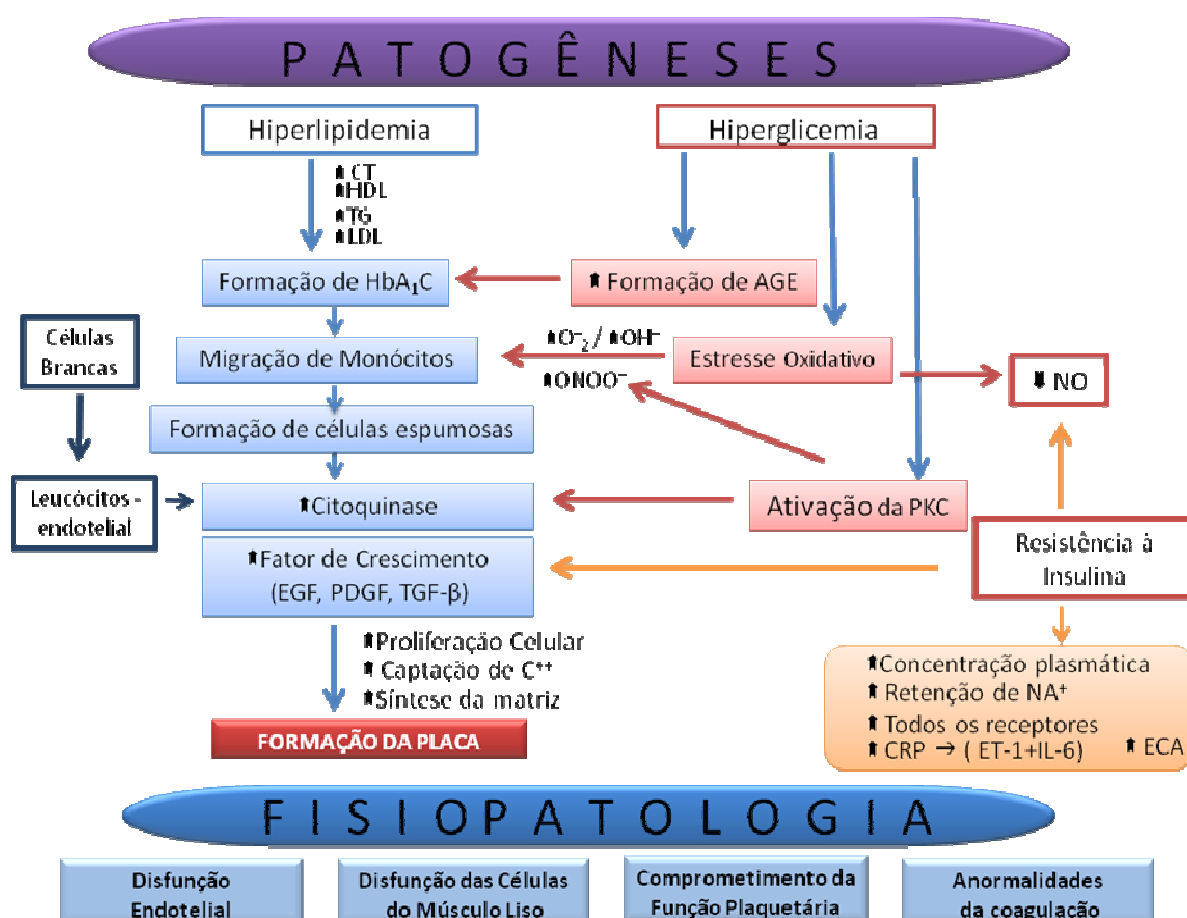


Figura 2 - Macroangiopatia diabética: patogêneses e fisiopatologia. AII, angiotensina II; ECA, enzima conversora da angiotensina; AGE, produtos avançados de glicosilação; CRP, proteína C reativa; EGF, fator de crescimento epidérmico; ET-1, endotelina-1; HbA_{1c}, hemoglobina A_{1c}; IL-6, interleucina-6; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos; PAI-1, inibidor de ativação de plasminogênio-1; PDGF, fator de crescimento derivado de plaqueta; PKC, proteína quinase C; TGF-β, fator de transformação do crescimento-β.

Fonte: Rahman et al. (2006), adaptado.

2. Endotélio e regulação do tônus vascular

A regulação do tônus vascular é mediada pela interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstrictores, assim como por alguns hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais mecânicos e/ou elétricos, além da própria pressão arterial (JACKSON, 2000; CRIBBS, 2006). O tônus basal é controlado por mecanismos celulares que regulam a concentração de cálcio intracelular e mediado por estímulos fisiológicos neuro-hormonais. A contração e o relaxamento do músculo liso (ML) são desencadeados por processos químicos que envolvem canais iônicos, os quais funcionam como moduladores do potencial de membrana e das concentrações de Ca^{2+} intracelular.

Os eventos elétricos que modificam o potencial de ação, produzindo despolarização ou hiperpolarização, podem ser citados como exemplos desses processos químicos (KNOT, et al., 1996; HORZOWITZ et al., 1996; HAKARI et al., 1997; WEBB, 2003; KEVIN; NELSON, 2005).

A estrutura da parede vascular tem características específicas para cada segmento do sistema circulatório, isto é, as proporções de endotélio, fibras elásticas, ML e tecido conjuntivo, que são determinadas de acordo com a funcionalidade de cada vaso sanguíneo (GUYTON; HALL, 2006). Deste modo, o ML, devido às suas propriedades contráteis, exerce um papel importante na regulação dinâmica do volume luminal do sistema vascular (KEVIN; NELSON, 2005), apresentando uma estrutura constituída por um grande número de filamentos de actina que se irradiam dos corpos densos e se sobrepõem a um filamento de miosina (Figura 3).

Esses corpos densos têm a mesma função dos discos Z do músculo esquelético e funcionam como estrutura de transmissão de forças mecânicas, proporcionando um acoplamento entre os miofilamentos e o estroma do tecido conectivo (SOMLYO et al., 1994). As membranas do ML possuem junções especializadas (*gap junctions*) que permitem que suas fibras se contraiam como um sincício (GUYTON; HALL, 2006), cujas células possuem além da actina e miosina, outras proteínas como o caldesmon, tropomiosina e a calmodulina. A calmodulina é uma proteína reguladora multifuncional que tem capacidade de se ligar aos íons Ca^{2+} , sendo um importante mediador em diversos sistemas, inclusive na contratilidade do ML (PAIVA et al., 2005).

A contração do ML pode ocorrer por dois mecanismos: o acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacodinâmico. O acoplamento eletromecânico é promovido pela despolarização da membrana celular que leva a entrada de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs), podendo esse potencial de membrana (E_m) celular ser modulado por vários tipos de canais iônicos, tais como os canais para K^+ , Cl^- e outros cátions (Na^+ , Ca^{2+}) (WELLMAN et al., 2003, PAIVA et al., 2005). Contudo, alguns agonistas como a NE, acetilcolina (ACh) e histamina são capazes de induzir contração por despolarização (BOLTON, 1979). O outro mecanismo, denominado acoplamento farmacodinâmico não depende da despolarização da membrana celular para regular a concentração $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular (SOMLYO; SOMLYO, 1968; REMBOLD, 1996; PIERCE; RUSSELL, 1997). No entanto, esse mecanismo envolve a interação de agonistas com os receptores da membrana das células musculares lisas, que são geralmente formados por sete domínios transmembranais, acoplados a um complexo de proteínas G (α , β e γ) (MELDRUM et al., 1991) (Figura 4). A contração do ML é regulada pela concentração $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e pela sensibilidade dos elementos contráteis ao Ca^{2+} (BOLTON, 1979). Essa sensibilidade foi denominada de dependência relativa da fosforilação da cadeia leve de miosina (CLM) ao $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (REMBOLD, 1992).

Assim sendo, os canais iônicos desempenham um importante papel na regulação da contração do ML, pois atuam modulando o E_m e conseqüentemente o Ca^{2+} intracelular (KEVIN; NELSON, 2005). Logo, a entrada do Ca^{2+} do meio extracelular é mediada pelos canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs), pelos canais operados por receptor (ROCCs), pelos canais para cátions não-seletivos e pelo trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$. Além disso, o retículo sarcoplasmático (RS) pode contribuir para o aumento do Ca^{2+} intracelular, liberando o Ca^{2+} de suas reservas pela ação do inositol trifosfato (IP_3) ou pelo próprio Ca^{2+} (WELLMAN et al., 2003). Ou seja, a elevação do Ca^{2+} intracelular ativa o receptor para rianodina (RYR) do RS e o IP_3 ativa o canal para Ca^{2+} dependente de IP_3 (FLYNN et al., 2001).

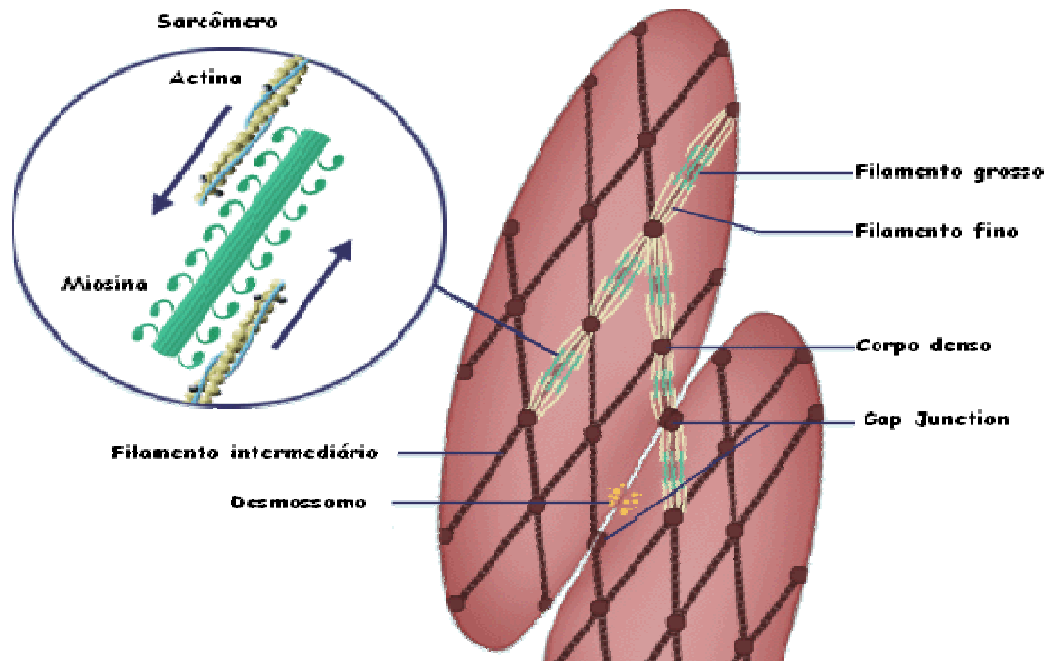


Figura 3 - Organização aparente do cito-esqueleto e miofilamentos do músculo liso. Pequenos elementos contráteis, funcionalmente equivalentes ao sarcômero. As ligações entre as fibras consistem em junções especializadas (*gap junctions*), funcionalmente acopladas ao aparelho contrátil das células adjacentes (sincício).

Fonte: McGraw-Hill (2002).

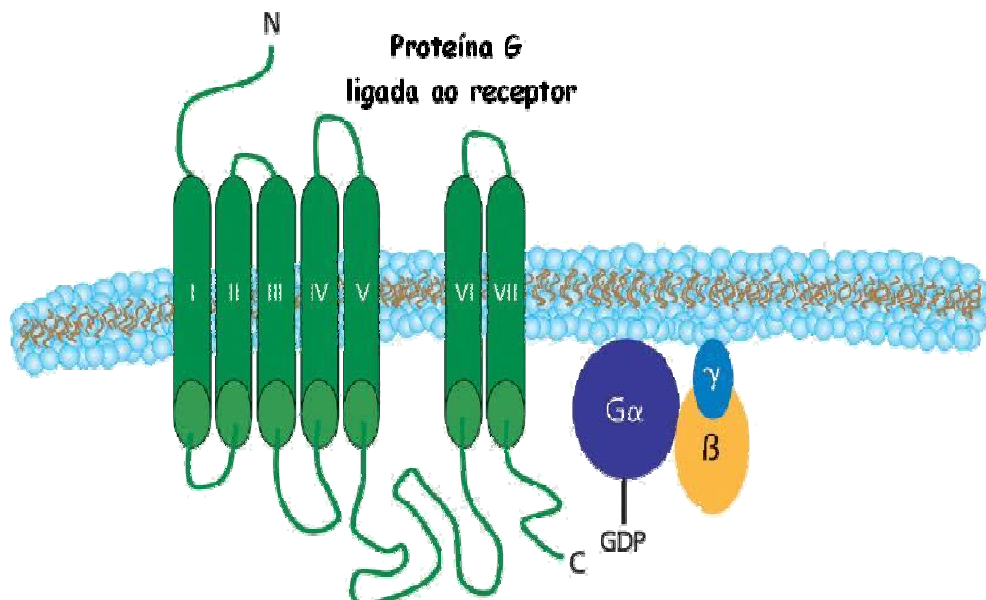


Figura 4 - Proteína G (α , β e γ) ligada ao receptor com sete domínios transmembranais.

Fonte: Schoneberg et al (1999)

O processo de contração é iniciado pela recepção de um estímulo contrátil específico que leva ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Assim, o Ca^{2+} mioplasmático se liga a calmodulina, que é capaz de se ligar até a quatro íons Ca^{2+} , formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a miosina quinase da cadeia leve (MLCK). A associação deste complexo Ca^{2+} - calmodulina com a MLCK na presença do ATP, fosforila a cadeia leve de miosina, permitindo a exposição dos sítios de ligação da miosina à actina, o que resulta na ligação cíclica da porção globular da miosina com a actina, permitindo o deslizamento dos filamentos de miosina sobre a actina, e determinando a contração (HUXLEY et al, 1954) que é mantida devido à fosforilação da subunidade de miosina que inibe a atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina (FLCM), uma enzima regulatória (WEBB, 2003). Essa mesma enzima remove o fosfato de alta energia da cadeia leve de miosina promovendo o relaxamento. Observando-se ainda, a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ devido à captação do Ca^{2+} para o RS ou pela extrusão pelas Ca^{2+} ATPases da membrana plasmática, levando à dissociação do complexo calmodulina - MLCK.

Vários estudos relatam a diminuição da disponibilidade de Ca^{2+} intracelular e a atuação de canais de K^+ ativados por cálcio, promovendo hiperpolarização e, por conseguinte o relaxamento muscular (BRAYDEN et al., 1991; IKEBE; BROZOVICH, 1996; IKEBE, 1997). Substâncias como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) e o fator atrial natriurético (FAN) que aumentam a 3'5'- guanosina monofosfato cíclico (GMPc), também relaxam o músculo liso vascular (MLV) por atenuação do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em células isoladas e tecidos intactos (KARAKI et al., 1988). O óxido nítrico (NO) induz o relaxamento no MLV principalmente via ativação do GMPc, envolvendo a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ através da ativação da Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática, do RS e da Na^+/K^+ ATPase e dos vários canais de K^+ (NISHIMURA, 2006). Esse relaxamento também pode ocorrer devido ao aumento de AMPc, através da ativação da proteína G quinase (PKG) (LINCOLN et al., 1990) ou da fosforilação via PKA, da MLCK reduzindo a sua afinidade pela calmodulina (MCDANIEL et al., 1991; SOMLYO et al., 1994). Além disso, o AMPc pode reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por ativar canais de K^+ levando à hiperpolarização de membrana e redução do influxo de Ca^{2+} via VOCCs (SADOSHIMA et al., 1988; LINCOLN et al., 1990).

Foram os trabalhos pioneiros de Furchgott e Zawadzki (1980) que demonstraram que o efeito vasodilatador da Ach foi dependente da integridade endotelial, sugerindo a existência de uma substância vasodilatadora derivada do endotélio, chamada de EDRF. Em 1987, Palmer, Ferige e Moncada demonstraram que a secreção de NO ocorria em quantidades

fisiológicas suficientes para justificar a atividade biológica do EDRF. Posteriormente, o aminoácido L-arginina foi identificado como precursor do NO (PALMER et al., 1987), sendo demonstrado que tinha uma alta difusão e reatividade e por isso diversos meios de regulação. Esta regulação envolve fatores de transcrição, translação e até de pós-translação que abrangem modificações lipídicas, eventos de fosforilação e interação com proteínas (KONE, 2003).

As enzimas responsáveis pela geração de NO são conhecidas como óxido nítrico sintetases (NOS), e catalisam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-arginina (L-Arg), formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do intermediário N ω -hidroxi-L-arginina (MARLETTA, 1988, 1993; MARLETTA et al., 1988; FELDMAN et al., 1993; FUKUTO; CHAUDHURI, 1995; IGNARRO; MURAD, 1995; KERWIN et al., 1995).

Três isoformas de NOS (NOS I, II e III) são codificadas por três genes diferentes e podem ser classificadas em duas famílias: NOS constitutiva (NOS I e NOS III) e NOS induzível (NOS II). As NOS constitutivas foram caracterizadas em neurônios (NOS I ou nNOS) e depois em células endoteliais (NOS III ou eNOS), sendo reguladas pelo complexo Ca²⁺/calmodulina (CaM). Estas isoformas produzem pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), e, neste caso, o NO parece desempenhar funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A NOS II (iNOS) foi primeiramente isolada de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e interferon- γ . Esta enzima é essencialmente Ca²⁺ independente e pode produzir NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão (KNOWLES; MONCADA, 1994; FÖRSTERMANN et al., 1994; 1998; FÖRSTERMANN; KLEINERT, 1995; IGNARRO; MURAD, 1995).

O L-NAME, um análogo da L-Arg substituído no grupamento guanidino (N ω), inibe todas as isoformas da NOS. Outros análogos da L-Arg substituídos no mesmo grupamento também são capazes de inibir a atividade da NOS. Neste caso, a inibição ocorre em graus variáveis e através de mecanismos distintos, porém todos envolvem a ocupação do sítio ligante para o substrato (MAYER; ANDREW, 1998; BOUCHER et al., 1999).

A [Ca²⁺]_i no endotélio vascular regula indiretamente o tônus vascular, ativando enzimas dependentes do Ca²⁺, tais como NOS e fosfolipase A2, resultando na produção de NO, prostaciclina e fatores de ativação de plaquetas (KARAKI et al., 1997). Portanto, a ativação de receptores endoteliais induz um influxo de Ca²⁺ no citoplasma da célula endotelial (Figura 5). Após a interação do Ca²⁺ com a calmodulina, ativa a NOS e as cicloxigenases, e

leva à liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). O produto destas substâncias difunde-se das células endoteliais para o MLV, onde o NO atua estimulando a enzima guanilato ciclase (GC), que catalisa a produção de GMPc e causa à inibição do processo contrátil, o EDHF causa hiperpolarização e relaxamento pela abertura dos canais de K^+ e as prostaciclina (PGI₂) causam relaxamento pela ativação da adenilato ciclase (AC) que conduz a formação do AMPc (VANHOUTTE, 2003).

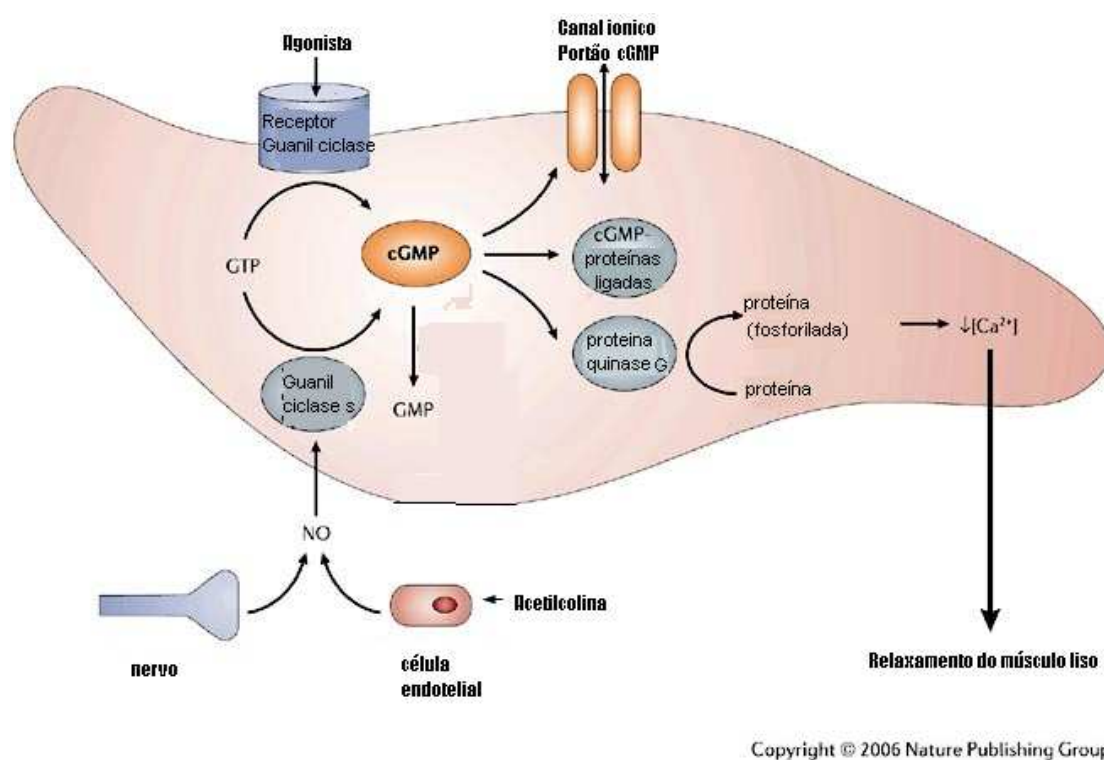


Figura 5 – Regulação do tônus vascular através da via do NO / cGMP. NO – óxido nítrico, cGMP - 3'5'- guanosina monofosfato cíclico.
Fonte: Ghofrani et al. (2006)

É importante salientar que o estresse de cisalhamento regula a estrutura e função das células endoteliais controlando a expressão de genes mecanossensíveis e produzindo fatores vasoativos (Figura 6). Assim, o mecanismo proposto para a regulação da enzima NOS envolve tanto o estresse de cisalhamento como a interação da NOS endotelial com proteínas, tais como a calmodulina, a caveolina I e receptores da proteína G, a tirosina quinase e a tirosina fosfatase (KONE, 2003).

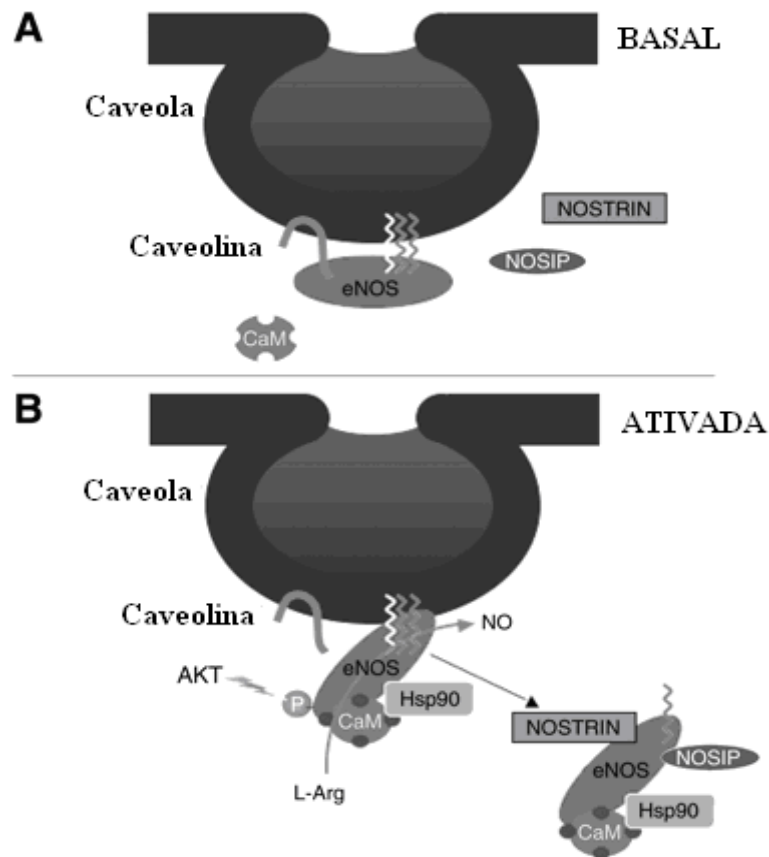


Figura 6 - Interação protéica regulando a NOS endotelial na caveola. A interação com a caveolina inibe a ativação da NOS endotelial (A), mas um estímulo como o estresse de cisalhamento promove o recrutamento de proteínas de choque térmico (Hsp) 90 e Ca^{2+} /CaM para a NOS(e), aumentando a sua atividade. B: AKT, ativada pelo estresse de cisalhamento, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), ou histamina, fosforila e ativa a NOS(e). A NOSIP (proteína de interação da NOS) e NOSTRIN (NOS(e) indutor de tráfego) participam na translocação do NOS (e) da caveola para o alvo intracelular resultando na diminuição da atividade da NOS(e).

Fonte: Adaptado de Kone (2003).

A identificação inicial da NOS na caveola (um micro-domínio de 50-100nm) na membrana plasmática das células, na década de 90, forneceu a base estrutural para o reconhecimento da compartimentalização nos mecanismos de sinalização celular promovido pelo NO (Figura 7). A subsequente observação de que a NOS endotelial (eNos) interage diretamente com as proteínas estruturais da caveola denominadas caveolinas, forneceu a evidência bioquímica da interação eNOS com a caveola e a sua implicação com numerosas moléculas de sinalizações concentradas neste ambiente da membrana celular (GARCIA-CARDENA et al., 1997; LI et al., 2005). Interações entre a eNOS e a caveolina-1 inibem a

atividade da enzima por competição com a ativação Ca^{+2} /calmodulina (BUCCI et al., 2000; COHEN et al., 2004). A caveola foi descrita pela primeira vez por Yamada (1955), mas sua importância só começou a ser destacada quando a caveolina foi clonada e identificada, havendo vários membros da família das caveolinas (caveolina 1- α e - β , caveolina-2- α , - β , - γ , -3) que diferem em sua estrutura e distribuição nos tecidos. A Caveolina-1 (cav-1) e caveolina-2 (cav-2) são abundantemente co-expressas em adipócitos, fibroblastos e células endoteliais, enquanto que expressão da caveolina-3 (cav-3) é verificada somente nas células musculares (ROTHBER et al., 1992). Os estudos que se seguiram mostram que as caveolas e caveolinas têm um papel importante na função endotelial e, por conseguinte, disfunções nas caveolas estão envolvidas em patologias como câncer, diabetes, aterosclerose e doenças cardiovasculares (SCHWENCKE et al., 2006; YU et al., 2006).

A disfunção endotelial descrita como redução do relaxamento dependente do endotélio e/ou aumento da capacidade vasoconstritora, está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como na obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, intolerância à glicose, etc. O desenvolvimento de disfunção endotelial foi demonstrado em vários leitos vasculares tanto em modelos experimentais como em pacientes com DM1 e DM2 (DIEDERICH et al., 1994; KOLTAI et al., 1997). É bem conhecido que o endotélio produz NO, mas também outros vasodilatadores como bradicinina, prostaciclina (PGI_2), PGD_2 , PGE_2 , EDHF (TOBOREK; KAISER, 1999; VANHOUTTE, 2003; NASCIMENTO et al., 2003) e metabólitos vasoconstrictores (endotelina-1 e prostanóides vasoconstrictores) (CARVALHO et al., 2006). É possível que no diabetes, a redução da vasodilatação produzida por NO esteja relacionada a diminuição da atividade de PGI_2 e EDHF e/ou à síntese aumentada de metabólitos da ciclooxigenase (TXA_2) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (CSANYI et al., 2007). Ademais, a produção aumentada de espécies de oxigênio reativo (ROS), como superóxidos, também pode ser a causa primária da disfunção endotelial.

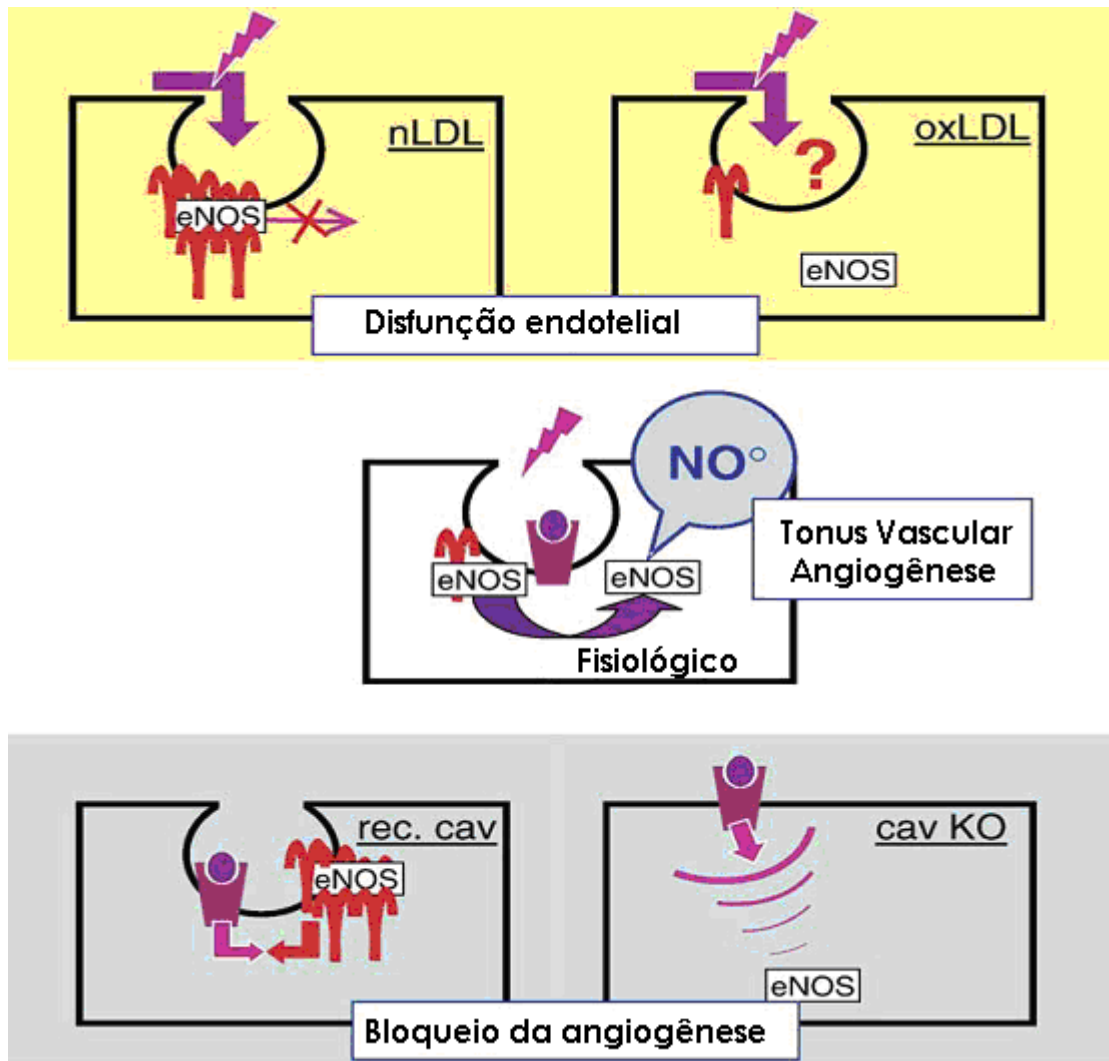


Figura 7 - Relação entre a caveolina e o óxido nítrico (NO) dependente do endotélio. Altos níveis de colesterol LDL nativo (LDL_n) estimula a transcrição de caveolina e, portanto, promove a interação inibitória de eNOS com o aumento da caveolina. A interação de LDL oxidado (LDL_{ox}) com o receptor “scavenger” CD 36 localizado na caveola marca a depleção de colesterol e a translocação de eNOS dentro do compartimento celular. O agonista fixado a seu receptor (localizado dentro ou translocado para a caveola) leva à ativação do eNOS através do aumento local do cálcio intracelular (o retículo endoplasmático tem sido localizado nas vizinhanças da caveola) e para as futuras alterações no estado de fosforilação do eNOS. Este modo de regulação da produção de NO é crítico para as funções endoteliais, incluindo a modulação do tônus vascular e angiogênese.

Fonte: Sbaa et al., 2005 (adaptado).

3. Canais para potássio

Os canais para potássio presentes no MLV possuem um importante papel na regulação do Em e do tônus vascular (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 1998). Eles constituem uma família de proteínas que atravessam a membrana de células excitáveis e não excitáveis, e conduzem seletivamente os íons potássio em favor do gradiente eletroquímico num fluxo de 10^6 a 10^8 íons/s. (SHIEH et al., 2000). Segundo Chandy (1990), esses canais são estruturas tetraméricas, contendo em cada uma das quatro subunidades seis regiões (S1-S6) de domínio transmembrana. A concentração do potássio é maior no meio intracelular e o seu potencial eletroquímico encontra-se entre -90 a -80 mV, sendo o potencial de equilíbrio do potássio determinante para o potencial de equilíbrio da membrana. Dessa forma, esses canais são importantes na fase de repolarização do potencial de ação, principalmente no músculo cardíaco (NELSON; QUAYLE, 1995).

O gradiente eletroquímico para o K^+ promove abertura dos canais de K^+ resultando na difusão dos cátions para fora da célula e hiperpolarização da membrana. O fechamento dos canais de K^+ desencadeia a despolarização (Figura 8) (JACKSON, 2000).

Dentre as categorias de canais para potássio tem-se: os canais para potássio dependente de voltagem (K_V), dependentes de cálcio (K_{Ca}), os canais de potássio retificadores de entrada (K_{IR}), sensíveis à ATP (K_{ATP}) e sensíveis ao sódio (K_{Na}) (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 1998). Esses canais são subdivididos, os canais K_{Ca} , por exemplo, são classificados em três tipos: canais para potássio dependentes de Ca^{2+} com condutância elevada (BK_{Ca}), os canais para potássio dependentes de Ca^{2+} com condutância intermediária (IK_{Ca}) e os canais para potássio dependentes de Ca^{2+} com condutância baixa (SK_{Ca}) (YE et al., 2004).

Os canais para potássio ativados pelo Ca^{2+} intracelular são encontrados nas células excitáveis e participam da regulação do Em e do tônus miogênico das pequenas artérias (QUAYLE; NELSON, 1997).

O MLV apresenta diversos tipos de canais que são caracterizados por diferenças na dependência de voltagem para ativação e inativação, na sensibilidade em relação aos inibidores e na condutância (OKABE et al., 1987). Foi também observado que a resposta mediada pelo EDHF depende da ativação dos canais SK_{Ca} e IK_{Ca} . (EICHLER et al., 2003).

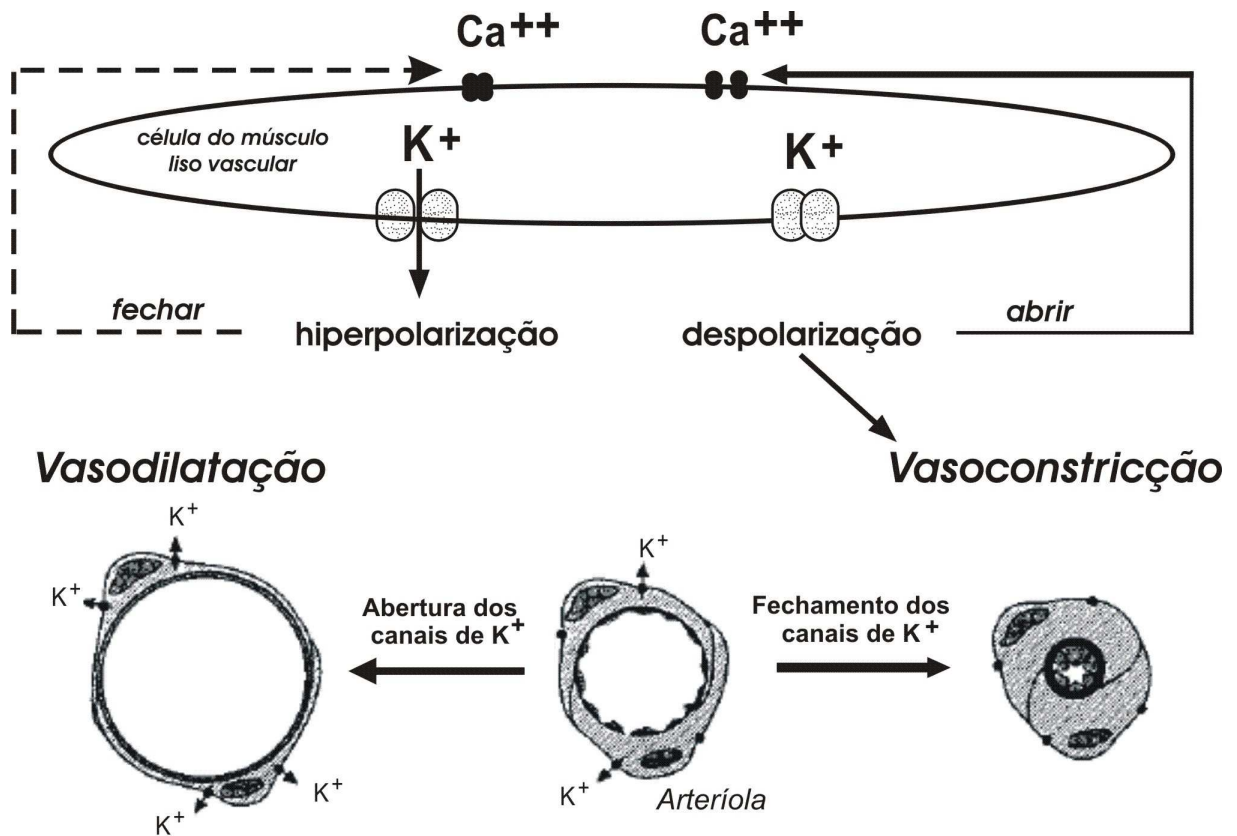


Figura 8 - Canais para potássio e o tônus vascular. Esquema do músculo liso vascular e da secção transversal da arteríola mostrando que a abertura dos canais para K^+ leva a difusão dos íons de K^+ para fora da célula, hiperpolarização da membrana, fechamento dos canais de cálcio, diminuição do cálcio intracelular, que leva a vasodilatação. O fechamento dos canais de K^+ tem o efeito oposto.

Fonte: Jackson (2000)

Os canais K_V são inibidos por 4-aminopiridina (4-AP) e ativados pela despolarização da membrana com potencial de ativação de aproximadamente -30 mV, havendo evidências que sugerem a participação desses canais na regulação do potencial de repouso da membrana e no tônus vascular. Eles podem ser abertos pelo mecanismo de ativação de vasodilatadores que acionam a via do AMPc, e podem ser fechados pela ativação da via que envolve a elevação do cálcio intracelular e a proteína kinase C, isto é, envolve a participação de vasoconstrictores (NELSON; QUAYLE, 1995; AIELLO et al., 1995; AIELLO et al., 1998).

O tetraetilamônio (TEA) e a 4-AP bloqueiam os canais para potássio por diferentes mecanismos e provavelmente em diferentes sítios de ligação (KIRSCH; DREWE, 1993; NELSON; QUAYLE, 1995; JENKINSON, 2006). O TEA é um bloqueador não seletivo de canais para potássio, mas na dose de 1 mmol/L parece ser seletivo para bloquear canais de K_{Ca} no MLV (LANGTON et al., 1991).

Os canais retificadores de potássio (K_{IR}) foram identificados pela primeira vez no músculo esquelético (KATZ, 1949), entretanto, os estudos disponibilizados na literatura para entender o papel exercido por esses canais na regulação do potencial de repouso da membrana e do tônus são conflitantes e escassos (JACKSON, 2007). Sabe-se que os canais K_{IR} contribuem para condutância de potássio durante o potencial de repouso da membrana, e para aumentar o potássio extracelular. As principais subfamílias desses canais são: o K_{IR} 2.0 (potente retificador de entrada) e o K_{IR} 3.0 (proteína G acoplada ao canal de potássio) (REN et al., 2003).

No leito vascular cerebral, coronário e do músculo esquelético, observou-se que o aumento do potássio extracelular ocasionou vasodilatação devido à hiperpolarização da membrana do MLV (KNOT et al., 1996; QUAYLE et al., 1997). A ativação do Na^+/K^+ ATPase e dos canais K_{IR} constituem os dois mecanismos propostos para explicar a hiperpolarização induzida por potássio. Entretanto, o papel do K_{IR} na indução da vasodilatação precisa ser esclarecido.

Os canais inibidos pela adenosina trifosfato (K_{ATP}) são proteínas octoméricas, compostas por dois poros que formam duas subunidades. A subunidade formada pelos canais retificadores de entrada (K_{IR} 6.1, K_{IR} 6.2) e uma unidade receptora de sulfoniluréia (SUR1, SUR2A e SUR2B) (NELSON; BONEV, 1996). Segundo Seino (2003) a subunidade K_{IR} 6.1 parece desempenhar um papel mais relevante na regulação do tônus vascular do que o K_{IR} 6.2.

Os canais do tipo K_{ATP} foram identificados pela primeira vez em miócitos cardíacos e depois foram identificados em outros tipos de células, como células do pâncreas, neurônios, músculo esquelético, MLV e outros tipos de músculo liso (NOMA, 1983; BABENKO et al., 1998; ASHCROFT; GRIBBLE, 1998; SEINO, 2003). Os canais K_{ATP} são fechados pelo aumento da concentração intracelular de ATP, mas também são regulados por uma série de mecanismos de tradução de sinais que independem de mudanças do ATP. São ativados por vários vasodilatadores sintéticos, como o diazóxido, cromacalín e pinacidil, e são inibidos por sulfoniluréias, como a glibenclamida (SMITH et al., 1994; QUAYLE et al., 1997; SEINO, 2003). A dilatação arteriolar induzida por adenosina, prostaciclina e isoproterenol é mediada em parte pela abertura dos canais K_{ATP} , demonstrando que esses canais têm um papel crucial na regulação do tônus vascular na microcirculação (JACKSON et al., 1993; JACKSON, 1993). A ativação dos K_{ATP} no músculo liso arterial leva à hiperpolarização do potencial de membrana, que causa vasodilatação devido à inibição de canais para cálcio dependente de voltagem (NELSON et al., 1990). Alguns estudos relatam a hipótese de que os canais K_{ATP} ,

presentes na microcirculação, podem ser ativados em condições de repouso (JACKSON et al., 1993; JACKSON, 1993; TATEISHI et al., 1995; SAITO et al., 1996). Entretanto, Thomas et al. (1997) relataram que a glibenclamida não promove efeito na resistência vascular do músculo esquelético de ratos. Através da técnica de *patch clamp* foi evidenciado pela primeira vez que durante o potencial de repouso da membrana celular existe a abertura de canais K_{ATP} em células do músculo liso de arteríola (JACKSON et al., 1997) e eles parecem participar do mecanismo de ação de substâncias vasodilatadoras, como a adenosina e prostaciclina, através do mecanismo de AMPc dependente e independente de proteína kinase A (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 1993). Ainda foi observado que alguns vasoconstrictores podem atuar fechando os canais K_{ATP} através do mecanismo que envolve a proteína kinase C (TATEISHI et al., 1995; NELSON; QUAYLE, 1995). Segundo Ren et al. (2003), os canais K_{ATP} podem contribuir para a condutância de K^+ , mas exerce um papel mais relevante no controle do Em das células β e outras células, porque podem se manter abertos sob condições metabólicas adversas.

Várias doenças podem estar correlacionadas com a disfunção dos canais de potássio, entre elas a hipertensão e o diabetes (MARTENS; GELBAND, 1996; YE et al., 2004). Alguns estudos relatam que a arritmogênese pode estar relacionada à diminuição das correntes repolarizantes de potássio (MAGYAR et al., 1992; SHIMONI et al., 1999). Ye et al. (2004) demonstraram que em anéis de aorta oriundos de camundongos da linhagem C573L/6J, a abertura de canais BK_{Ca} era aumentada embora a condutância desses canais fosse diminuída, sugerindo que a função dos canais BK_{Ca} estaria aumentada para compensar os danos da hiperglicemia.

Há estudos que relatam que a função dos canais K_{Ca} , K_{ATP} e K_V estão diretamente ou indiretamente reduzida em ratos diabéticos, mas outros estudos afirmam o inverso (ZIMMERMANN et al., 1997; IKENAGA et al., 2000; MISURSKI et al., 2002). Ren et al. (2003), demonstraram *downregulation* do receptor SUR 2A no coração e SUR 2B no MLV de ratos diabéticos, sugerindo que o diabetes altera a expressão das subunidades específicas do canal K_{ATP} que pode levar à disfunção cardíaca por isquemia e disfunção vascular. Entretanto, no mesmo estudo, não houve alterações importantes na expressão do RNAm das subunidades K_{IR} 6.2 e K_{IR} 6.1 do canal K_{ATP} , bem como as subfamílias K_{IR} 2.1 e K_{IR} 3.1 de ratos diabéticos. Esses canais K_{IR} e K_{ATP} são importantes subfamílias dos canais para potássio, e estão bem expressos no tecido cardiovascular. Vários estudos relatam que a resposta arteriolar e a resistência arterial a um agonista do canal K_{ATP} é menos eficiente durante o diabetes

experimental, sugerindo a participação destes canais no desenvolvimento de complicações vasculares no diabetes (MAYHAN; FARACI, 1993; MAYHAN, 1994; ZIMMERMANN et al., 1997; CRIJNS et al., 1998; IKENAGA et al., 2000).

4. Diabetes e Programação fetal

A proposta de que o metabolismo materno poderia exercer efeitos tardios no desenvolvimento humano foi sugerida há vários anos (KARLSSON et al., 1972; PEDERSEN, 1977; SIMPSON et al., 1983). Diversos estudos epidemiológicos relataram que crianças nascidas de mães portadoras de DG, desenvolveram, durante a vida adulta, resistência à insulina e foram mais susceptíveis a desenvolver DG (PETIT et al., 1988, MARTIN et al., 1985, SOBNGWI et al., 2003, MCLEAN et al., 2006), doenças coronárias e outras doenças crônicas (BAKER et al., 1993).

Entretanto, a hipótese da origem fetal para várias doenças foi aprimorada por Barker et al. (1989), que fez associação entre doença cardiovascular e baixo peso ao nascimento, e mais tarde, entre o desenvolvimento do DM2 na vida adulta e baixo peso ao nascimento (BARKER et al., 1989, WHINCUP et al., 1992; CAMPBELL et al., 1996). Hales e Barker (2001) foram os primeiros a usarem o termo '*thrifty phenotype hypothesis*' (Figura 9), sugerindo que em caso de nutrição fetal deficiente, quer seja resultante de deficiência na nutrição materna ou no aporte para o feto devido disfunção placentária, por exemplo, ocorre uma adaptação que reduz o crescimento de órgãos importantes como cérebro a expensas de outros tecidos como músculos, rins, e pâncreas endócrino (REMACLE et al., 2007).

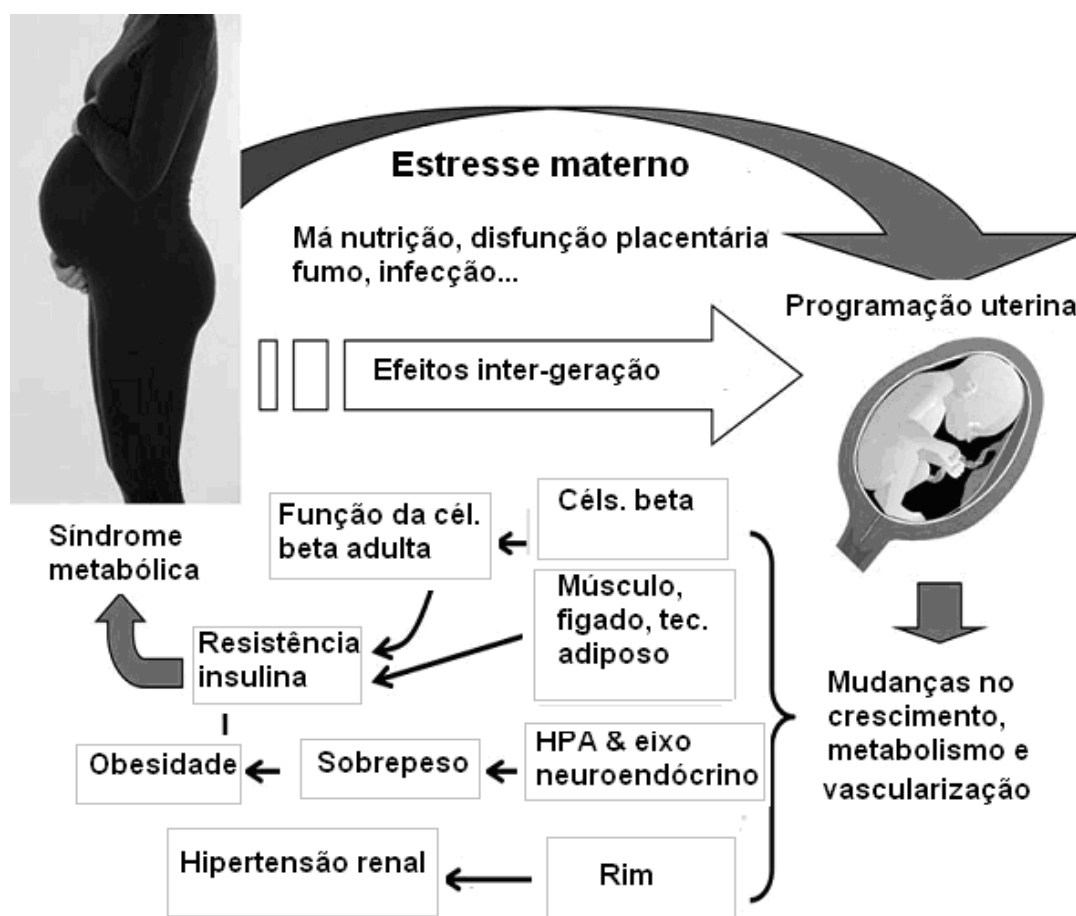


Figura 9 - Esquema do efeito da programação fetal em um ambiente comprometido. HPA: eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

Fonte: Fernandez-Twinn e Ozanne, 2006, adaptado.

Outros estudos epidemiológicos ratificaram essa hipótese associativa, como a relação inversa entre peso corporal após o nascimento e a hipertensão arterial (HUXLEY et al., 1996; LAW et al., 1996; MOORE et al., 1999; LAW et al., 2002). Existindo ainda várias evidências que distúrbios dietéticos (LANGLEY et al., 1994; LANGLEY-EVANS, 1998) e metabólicos (HOLEMANS et al., 1991; HOLEMANS et al., 2003; WICHI et al., 2005) durante o período gestacional poderia afetar o desenvolvimento fetal e contribuir para diversas patologias na vida adulta, entre elas as doenças cardiovasculares. A má nutrição intra-uterina, por exemplo, levaria ao desenvolvimento inapropriado do pâncreas, resultando em uma população de células β que secretam quantidades insuficientes de insulina e são incapazes de atender a demanda metabólica na vida adulta.

A condição metabólica é um importante determinante do crescimento fetal. Evidências experimentais indicam que o fator ambiental que regula o crescimento fetal, no terceiro trimestre, em animais e humanos, é o aporte de nutrientes que chegam ao feto. Diabetes gestacional, bem como má nutrição materna, é caracterizada por deficiência do aporte de nutrientes para a unidade feto-placentária e redução do fluxo sanguíneo útero-placentário (ERIKSSON; JANSSON, 1984; ROSSO; KAVA, 1980).

Diabetes e má nutrição durante a gestação estão implicadas na incidência aumentada de sobrepeso, homeostase da glicose alterada e DM2 na prole. Os distúrbios no balanço de nutrientes no DG promovem efeitos deletérios no pâncreas endócrino, no cérebro, pulmões, rins e coração dos fetos de ratos (AMIR et al., 1999; GAUGUIER et al., 1990, HOLEMANS et al., 2003; THULESEN et al., 2000). Entretanto, ainda não há confirmação de que o DG programe o desenvolvimento de hipertensão em ratos adultos, mas há evidências que sugerem que os filhotes apresentam na vida adulta alterações da função vascular (HOLEMANS et al., 1999) e RI (HOLEMANS et al., 2003). Evidências diretas sobre o mecanismo responsável pela programação anormal de tolerância a glicose na prole de mães diabéticas ainda não são disponíveis. Mecanismos epigenéticos como a programação genômica podem contribuir para a “programação” de doenças na vida adulta. As modificações epigenéticas são induzidas por fatores ambientais e afetam a estrutura e função do DNA. A ativação preferencial dos genes inerentes à mãe ou ao pai podem ser influenciados pelo ambiente intra-uterino (YOUNG, 2001). Manderson et al. (2002) relataram importantes diferenças nos fatores de risco para doenças cardiovasculares entre crianças nascidas de mães diabéticas tipo 1 e de mães não diabéticas, sugerindo que os filhos de mães diabéticas correm maior risco de desenvolver doenças vasculares na vida adulta.

Em roedores, foi observado que baixas doses de STZ induzem DG associada com macrosomia (AERTS; ASSCHE, 1979), e altas doses induzem diabetes DM1 associada à redução do crescimento fetal (HOLEMANS et al., 1991). Esses últimos autores demonstraram que ratos oriundos de mães com DG possuíam RI devido à diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos de captação periférica de glicose e pela diminuição da sensibilidade e resposta do fígado. Também foram constatados sinais de disfunção vascular com redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e aumento da resposta vasoconstrictora à NE (HOLEMANS et al., 1991). Alguns autores sugerem que o DG afeta a função cardiovascular da prole, promovendo hipertensão, disfunção do barorreflexo, ativação do sistema renina-angiotensina, disfunção renal (AMRI et al. 1999; ROCHA et al., 2005; CAVANAL et al.,

2007; MAGATON et al., 2007) e diminuição na resposta vasodilatadora dependente de endotélio (ROCHA et al., 2005; WICHI et al., 2005), ou ainda, alterações na reabsorção de cálcio e magnésio que interfere na formação óssea, caracterizada por uma menor deposição trabecular e maior volume cortical (BOND et al., 2005).

5. Diabetes experimental

Modelos animais de DM 1 e DM 2, produzidos espontaneamente ou por modificação genética, bem como a indução farmacológica, têm sido ferramentas indispensáveis para entender os mecanismos fisiopatológicos e assegurar novas estratégias terapêuticas no tratamento do diabetes.

O diabetes experimental pode ser induzido por vários métodos como, por exemplo, a lesão no sistema nervoso central, uso de hormônios anti-insulínicos, exposição à hidrocortisona, indução por vírus, alterações dietéticas, manipulação genética e agentes químicos citotóxicos. Assim sendo, foi mostrado que ratas com lesões no núcleo ventromedial do hipotálamo apresentam obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e RI (KENNEDY et al., 1963). Dentre os hormônios anti-insulínicos que levam a um quadro de hiperglicemia, têm-se a epinefrina, o glucagon, a somatotropina e os glicocorticóides. Além destes modelos, existe a administração de hidrocortisona, que também induz a hiperglicemia e leva à hiperplasia das células β do pâncreas (FRANKEL et al., 1984). Alguns vírus, como o picornavírus e o vírus da encefalomiocardite, podem causar dano pancreático e promover uma síndrome diabética moderada e transitória em alguns animais (REID, 1981). As alterações dietéticas, como a desnutrição (HEARD; TURNER, 1967) e dieta hipercalórica, também promovem o diabetes experimental (EL AOUI et al., 2007).

A manipulação genética fornece vários modelos de diabetes espontânea semelhante ao DM 1 humano, como o camundongo *Non obese Diabetic* (NOD), um modelo de doença auto-imune que destrói as células beta do pâncreas e rejeita o transplante das ilhotas de Langerhans (KOULMANDA et al., 2003), o rato *Bio Breeding* (BB) que desenvolve poliúria, polidipsia, perda de peso, hiperglicemia e insulinemia, e o *Bio Breeding Diabetic Prone* (DP-BB), que desenvolve uma insulinite severa (VISSER et al., 2003).

Os modelos de animais de DM 2 são complexos e heterogêneos como na condição humana, assim em alguns modelos, predominam a RI ou a disfunção das células β , ou ambas as alterações. Alguns destes modelos de DM 2 são o rato Goto Katazaki (GK), que apresenta tanto a disfunção das células β como RI (SIM et al., 2007), o camundongo KK, apresenta obesidade, RI e hiperinsulinemia compensatória e o rato Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) desenvolve intolerância à glicose (REES; ALCOLADO, 2004).

Dentre os agentes químicos citotóxicos mais utilizados estão a aloxana e a estreptozotocina (STZ), que causam destruição seletiva das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Ambas as drogas causam um elevado índice de mortalidade, entretanto, é de fácil manuseio na indução do diabetes em ratos, camundongos e coelhos (MINATOUGH et al., 1999; ZHANG et al., 2007). A STZ é um análogo da N-acetilglucosamina (GlcNAc), que é facilmente transportada nas células beta-pancreáticas pela GLUT-2, e causa a toxicidade destas células, resultando em deficiência da insulina. Nesse contexto, a STZ inibe seletivamente a atividade da O-GlcNAcase, que é responsável pela remoção da O-GlcNAc da proteína. Isto causa O-glicosilação das proteínas intracelulares e resulta em apoptose das células beta-pancreáticas (TESCH; ALLEN, 2007). Por estas razões, a STZ é muito utilizada para induzir o DM1 em ratos (OZTURK et al., 1996), provocando hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria e perda de peso (KANNEL; MCGEE, 1979; TOMLINSON et al., 1992; SCHAAN et al., 1997).

A STZ exerce sua ação diabetogênica quando administrada através da via intravenosa (i.v.) e intraperitoneal (i.p.); a sensibilidade varia segundo a espécie animal, sexo, idade e estado nutricional (BAILEY et al., 1990). Ela danifica a membrana plasmática e o DNA das células β pancreáticas, resultando em necrose. Embora a STZ seja claramente tóxica, possui uma meia vida de trinta minutos.,

Alguns estudos mostram que em ratos da linhagem Wistar, a dose de 35 mg/kg de STZ produz DM1 com glicemia entre 180-250 mg/dL (STRIFFLER et al., 2004; UGOCHUKWU et al., 2004), a dose de 65 mg/kg produz DM1 com glicemia acima de 350 mg/dL, caracterizando uma diabetes severa (MIHM et al., 2001; UGOCHUKWU et al., 2004). Segundo Caluwaerts et al. (2003), o nível normal de glicose para ratos é abaixo de 100 mg/dL, entre 100-300 mg/dL a hiperglicemia seria moderada, e acima de 300 mg/dL a hiperglicemia seria severa. Foi observado que cada grupo de animais submetidos a diferentes doses de STZ (i.p.) apresentaram níveis diferentes de glicemia. Lopez-Soldado et al. (2003), observaram que fêmeas com DG induzida por uma dose de 35 mg/kg apresentaram níveis de

glicose abaixo de 200 mg/dL, ou uma glicemia acima de 400 mg/dL devido à variabilidade da sensibilidade à droga.

Apesar de vários estudos utilizarem o modelo do diabetes experimental para investigar a correlação com alterações cardiovasculares, poucos analisam a importância do diabetes gestacional na resposta vascular e no desenvolvimento de hipertensão na vida adulta, razão que nos levou a realizar esta investigação.

II - OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a influência do diabetes gestacional (DG) induzido por estreptozotocina sobre os níveis pressóricos e a reatividade da aorta torácica da prole adulta.

2. Objetivos Específicos

Avaliar o impacto do diabetes gestacional sobre:

- i)** a ingestão de água, ração, peso corporal e peso do coração;
- ii)** as taxas plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDLc.
- iii)** a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)
- iv)** a reatividade vascular

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, criados no Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Os animais foram mantidos à temperatura constante de $21 \pm 2^\circ \text{C}$, e ciclo luminoso claro - escuro de 12 horas, ração (Purina[®]) e água *ad libitum*. Aos três meses de idade, fêmeas nulíparas (240-300 g) foram selecionadas e acasaladas. Esfregaço vaginal foi realizado todas as manhãs, e quando observada a presença de espermatozóide, foi considerado o primeiro dia de gestação. No sétimo dia de gestação, estreptozotocina (STZ, Sigma Chemical Company, St. Louis) foi administrada via intraperitoneal (i.p.) na dose de 42 mg/kg dissolvida em tampão citrato (0,01M; pH 4,5). Fêmeas controles receberam tampão citrato. Logo, as fêmeas foram divididas em dois grupos: grupo controle (ND) e grupo diabetes gestacional (DG). Os níveis de glicose foram estimados com o uso de um glicosímetro (Lifescan[®], Johnson & Johnson Company, EUA) no 14º dia de gestação.

Ratas com glicemia acima de 200 mg/dL foram consideradas diabéticas. Animais com níveis glicêmicos abaixo do valor estipulado foram descartados. O consumo de água e ração foi medido, assim como peso corporal. Neste estudo, foram utilizadas apenas as proles dos dois grupos, nomeadas de acordo com a origem. As fêmeas foram usadas em outros protocolos experimentais.

Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (processo 006921/2004-30).

2. Drogas Utilizadas

Para os experimentos *in vivo*, o pentobarbital sódico (Sanofi, Libourne, França) e a heparina (Laboratórios Léo S.A, Montigny-le-Bretonneux, França) foram utilizados em soluções injetáveis comercialmente disponíveis. O éter etílico p.a. (Reagentes Analíticos Dinâmica) foi utilizado para coleta de sangue através do plexo orbital.

Nos experimentos *in vitro*, cloridrato de acetilcolina, cloridrato de norepinefrina, tetraetilamônio, 4-aminopiridina, glibenclamida, diazóxido, nitroprussiato de sódio e verapamil, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A) e dissolvidos em água destilada.

3. Curva de crescimento ponderal

Apenas alguns recém natos foram pesados no dia do nascimento, mas o peso corporal (PC) de toda prole de ambos os grupos foi mensurado semanalmente durante o mesmo horário da manhã, desde da idade de 56º dias até os 4 meses de idade.

4. Consumo alimentar e hídrico

O consumo de ração foi medido durante o período gestacional. No 35º dia após o desmame, o consumo de ração e água dos filhotes também foi avaliado.

5. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Aos 120 dias de idade, amostras de sangue da prole de ambos os grupos foram obtidas pelo plexo retro-orbital sob leve anestesia com éter etílico, usando tubos capilares. As amostras de sangue foram depositadas em tubos de Eppendorf, centrifugadas a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos, a 4°C. Os plasmas ou soros foram separados e usados nos diferentes testes bioquímicos (glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL). Sendo usados kits enzimáticos específicos (Labtest[®]) para as dosagens. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com filtros de acordo com indicação do kit.

6. Determinação da PAM e FC da prole adulta de animais submetidos ao diabetes gestacional

Aos quatro meses de idade, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, intraperitoneal) e um cateter de polietileno heparinizado (125 UI/mL em salina isotônica) foi implantado na aorta abdominal (para o registro da PA e da FC). Este cateter foi exteriorizado dorsalmente, ao nível da nuca. Após a cirurgia, os animais receberam penicilina G-benzatina (24000 UI) sendo mantidos 24 horas em gaiolas individuais para recuperação cirúrgica.

Sistema de registro

No momento do experimento, o cateter aórtico foi conectado a um transdutor de pressão (Statham P23 DI, Gould) acoplado a um polígrafo Gilson modelo 5/6H (Gilson Medical Electronics, Middletown, Wis, USA). Esta unidade forneceu a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD). A pressão arterial média (PAM) basal foi calculada através da fórmula: $PAD + [(PAS - PAD)/3]$. A FC foi obtida por derivação do sinal da PA através de um cardiotacômetro.

7. Preparação da aorta isolada

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram eutanasiados sob anestesia, seguida de deslocamento cervical. Após toracotomia e excisão do coração para outros experimentos, a aorta torácica foi removida e imersa em solução de perfusão à temperatura ambiente. Após remoção do tecido gorduroso e tecido conectivo, a aorta foi cortada transversalmente em segmentos cilíndrico conectados a uma peça triangular de aço que os manteve suspensos em banho de órgão isolado com capacidade de 5mL, contendo a solução de perfusão Tyrode modificada mantida a 37°C. Esta solução continha (em mmol/L): NaCl 136, KCl 5; MgCl₂ 0,98; CaCl₂ 2; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5. A solução foi continuamente aerada, mantendo o pH 7,4. Os anéis de aortas com endotélio foram

submetidos a uma tensão passiva de 0.5 g, sendo registrada com um transdutor de força isométrico (Grass Model FTO3, Quincy, Mass., USA), conectado a um sistema computadorizado de aquisição de dados (DATAQ, Akron, OH, USA) (Figura 9). Após um período de equilíbrio de no mínimo 60 min., contrações controles foram induzidas pela adição de uma concentração submáxima (60mM) de cloreto de potássio (KCl) ao banho. Após atingir o platô, as preparações foram lavadas. Quando duas contrações sucessivas mostraram amplitudes similares, a preparação foi considerada equilibrada (LAHLOU et al., 2002).

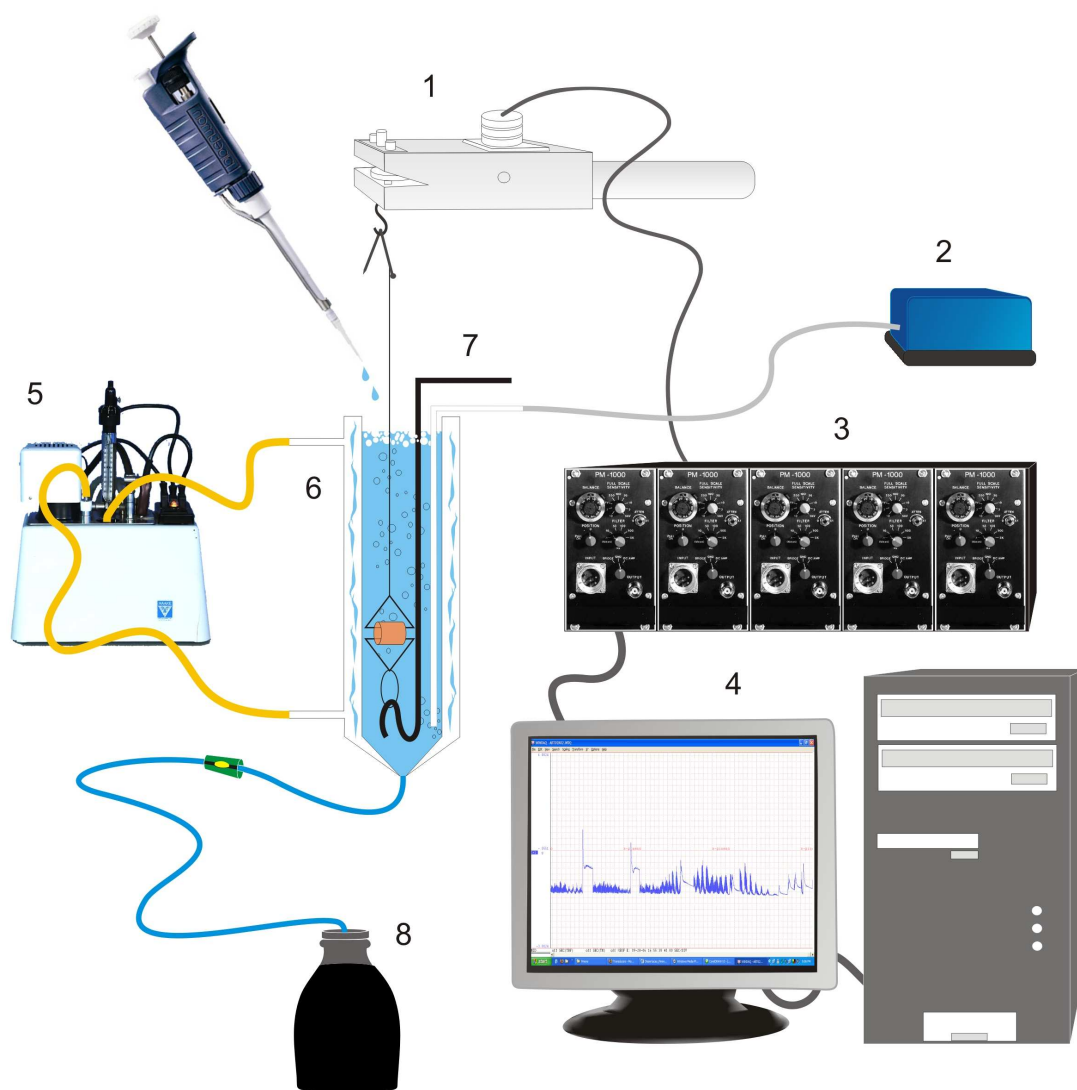


Figura 10 - Esquema simplificado do *set up* utilizado nos experimentos de aorta; 1. Transdutor de força Grass FT03C; 2. Bomba de oxigenação; 3. Amplificador DATAQ PM-1000; 4. Sistema Windaq DI-200; 5. Banho de circulação Haake FJ; 6. Cuba 5 mL; 7. Haste Fixa; 8. Coletor.

O protocolo de avaliação da reatividade vascular foi constituído por cinco séries que foram executadas como se segue:

1ª Série

Para avaliar o relaxamento induzido por Ach (1mM) na presença do endotélio, as preparações dos anéis de aorta foram pré-contraídas com NE (1 μ M), após atingir o platô foi realizada uma curva cumulativa com Ach (0,1-10 μ M) (Figura 11).

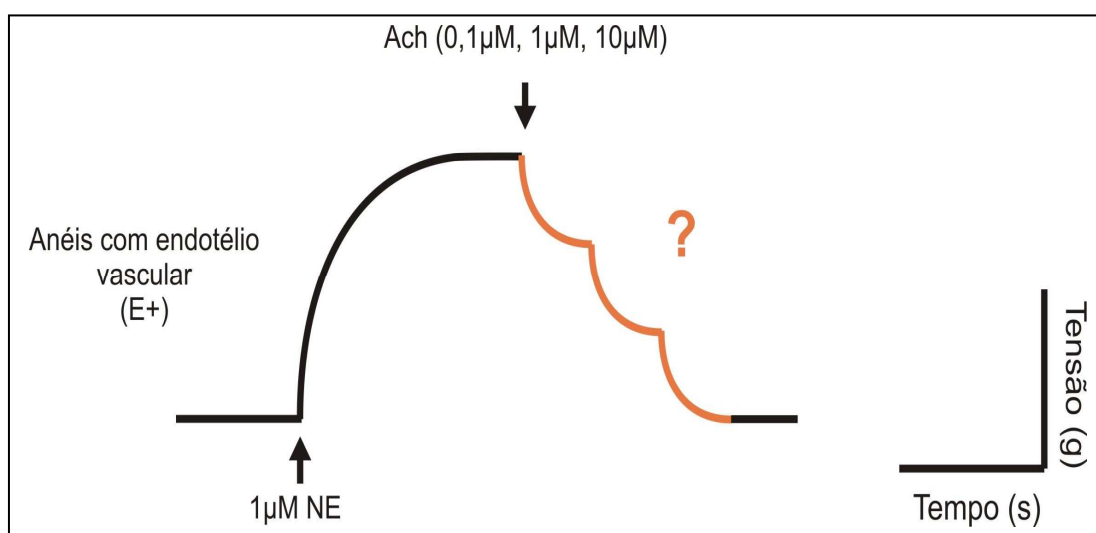


Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (Ach, 0,1-10 μ M) em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraídos com norepinefrina (NE, 1 μ M).

2ª Série

Para avaliar a contribuição dos canais de potássio no efeito relaxante da ACh em preparações de aorta, tetraetilamônio (TEA, 5mM), 4-aminopiridina (4-AP, 3mM) e glibenclamida (10 μ M) - bloqueadores dos canais para K⁺ inespecíficos, voltagem dependentes e sensíveis a ATP, respectivamente, ou diazóxido (100 μ M) (um abridor do canal para K⁺ sensíveis ao ATP intracelular) foram adicionados as preparações da aorta, e em seguida os anéis foram contraídos com 1 μ M de NE. Após atingir platô foi realizada a curva com Ach (0,1-10 μ M) (Figuras 12 a15).

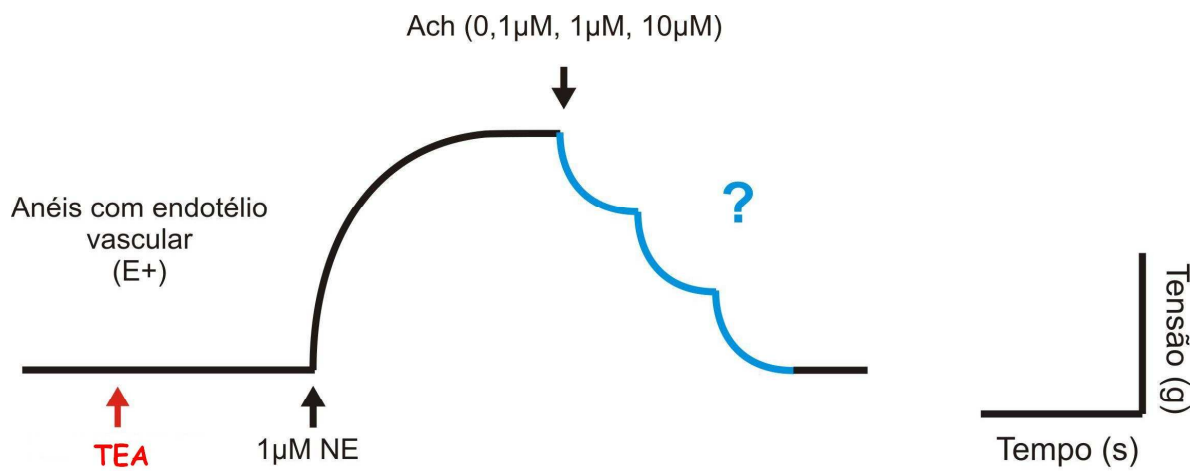


Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (ACh , 0,1-10μM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com tetraetilamônio (TEA) e pré-contráídos com norepinefrina (NE, 1μM).

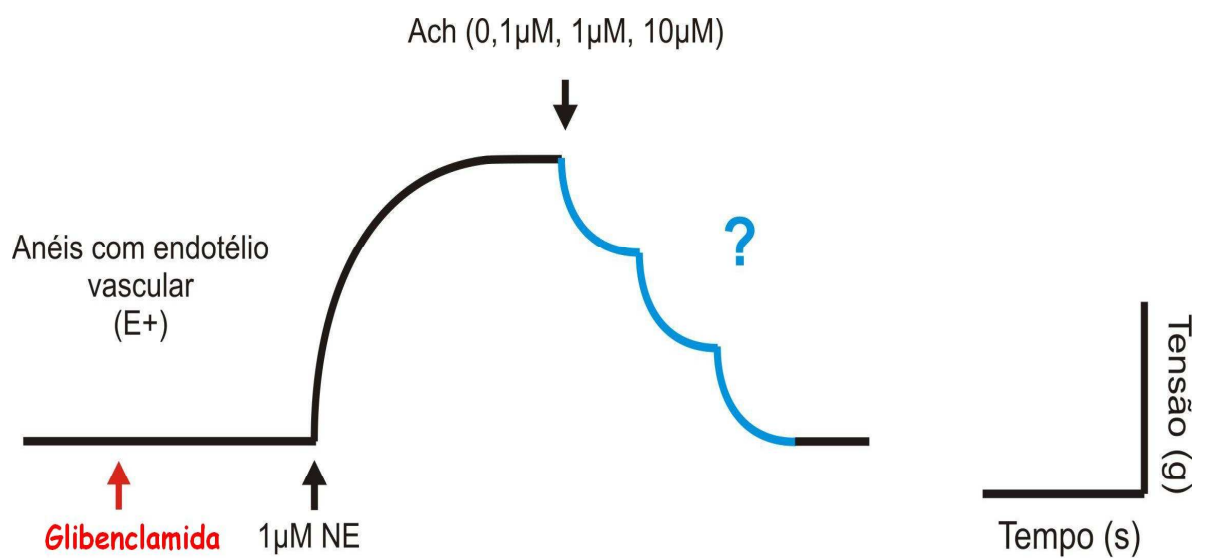


Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (ACh , 0,1-10μM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com glibenclamida e pré-contráídos com norepinefrina (NE, 1μM).

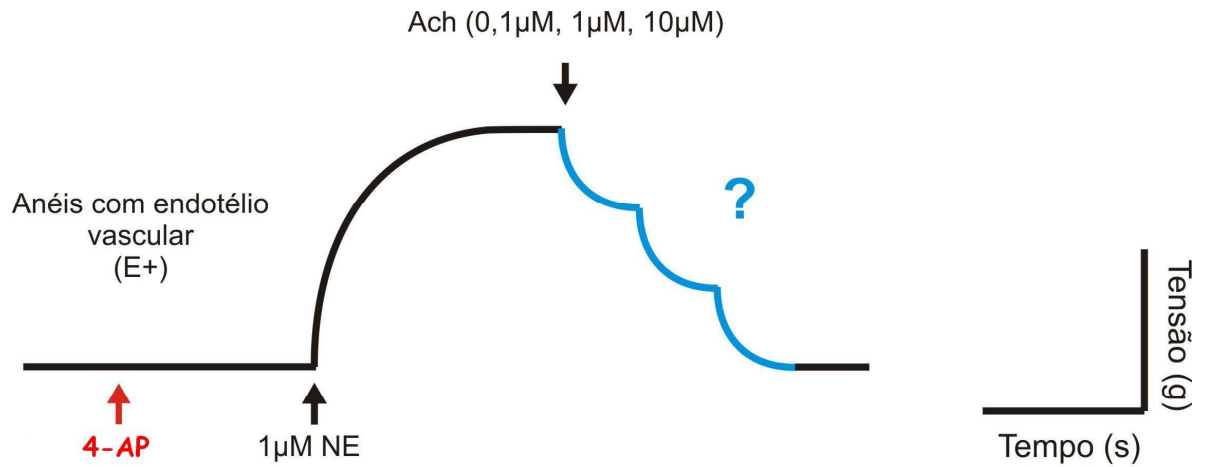


Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (ACh, 0,1-10 μ M) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com 4-aminopiridina (4-AP) e pré-contráídos com norepinefrina (NE, 1 μ M).

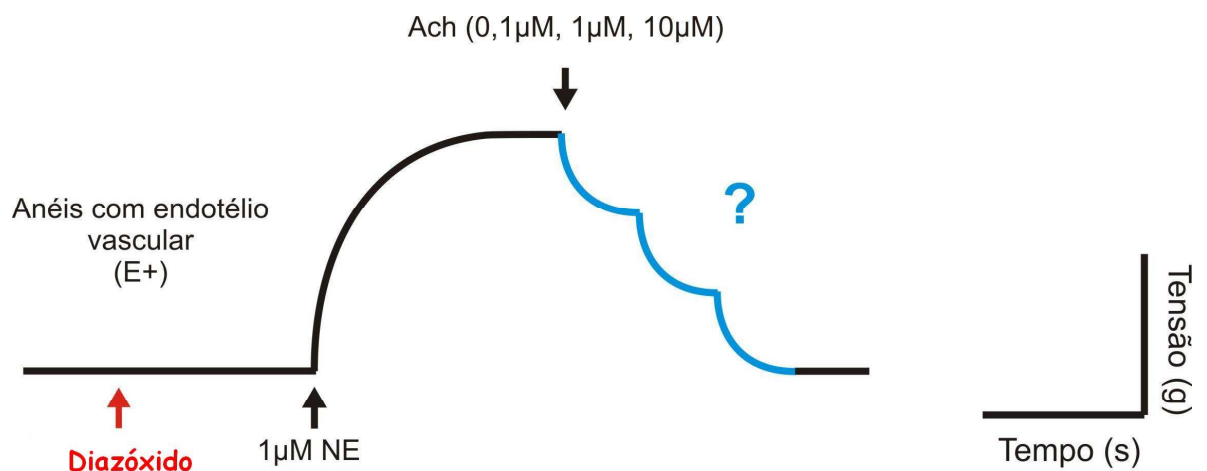


Figura 15- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante da acetilcolina (ACh, 1mM) em preparações de aorta com endotélio funcional pré-tratadas com diazóxido e pré-contráídos com norepinefrina (NE, 1 μ M).

3ª Série

Para avaliar a resposta vasodilatadora em preparações de aorta sem endotélio e pré-contráidas com NE, foi adicionado concentrações crescentes (0,1-10nM) de nitroprussiato de sódio (NPS) (Figura 16).

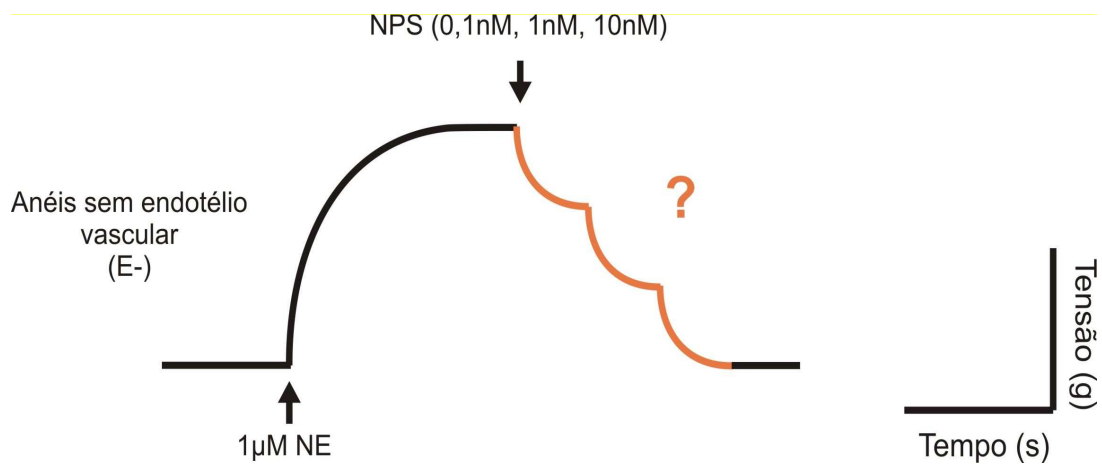


Figura 16 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante do nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1-10nM) em preparações de anéis de aorta torácica de ratos, pré-contráidos com norepinefrina (NE, 1µM).

4ª Série

Esta série de experimentos foi realizada com o objetivo de avaliar a contração induzida por NE (10µM), isto é, analisar a resposta alfa-adrenérgica vascular em preparações de aorta obtidas da prole de animais submetidos a DG e animais controles. Desse modo, foi obtida a curva concentração-resposta para a NE (1 – 1000nM) (Figura 17).

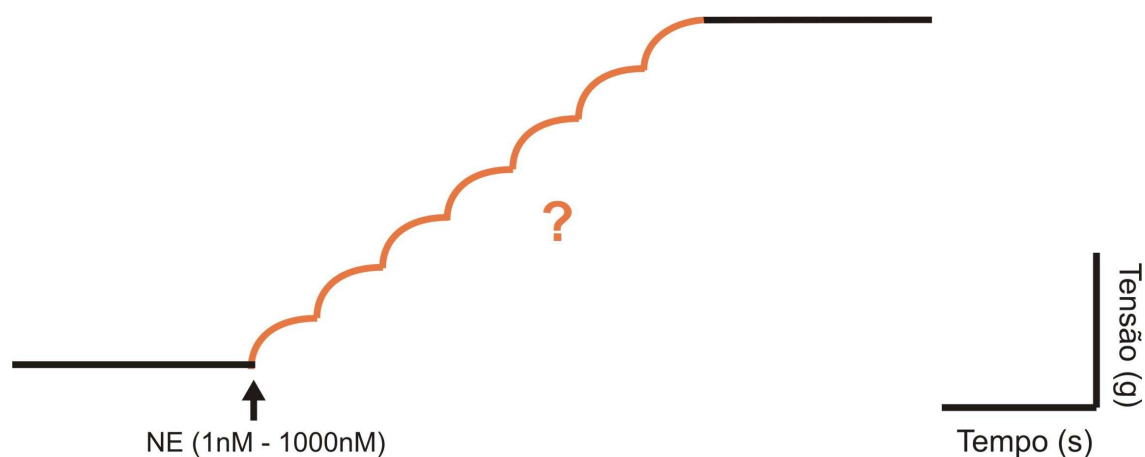


Figura 17 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta alfa-adrenérgica em preparações de anéis de aorta isolada de rato através da curva concentração-resposta para norepinefrina (NE, 1 – 1000nM).

8. Efeitos do diabetes gestacional sobre os parâmetros anatômicos do coração

Ao mesmo tempo em que foi efetuada a retirada da aorta torácica para os experimentos supramencionados, os corações foram excisados. Os átrios foram ablados e os ventrículos pesados para avaliação do peso úmido. Logo depois foram secos em estufa a 70°C durante 48 horas, e repesados para avaliação do peso seco. A relação peso do coração seco/peso corporal foi determinada e usada como índice de atrofia/ hipertrofia cardíaca (KNUFMAN et al, 1987; LAHLOU et al, 1998) e comparada entre os grupos DG e ND.

9. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos em variações médias $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). O teste t pareado e não pareado foram utilizados. Para análise de bloco foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a uma via ou duas vias, seguida pelo teste de Tukey quando a diferença foi significativa. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

IV - RESULTADOS

2. Efeitos do tratamento com estreptozotocina sobre a ingestão de água e ração em ratas prenhas

Neste estudo, foi mensurado o consumo de água e ração de algumas ratas DG induzido pela administração de STZ (42 mg/kg i.p.) no sétimo dia de gestação e, comparado a ratas prenhas tratadas com o veículo (ND). Os níveis de glicose observados nas fêmeas foram significativamente elevados ($p < 0,001$) no 14º dia após a administração de STZ ($243,0 \pm 13,5$ mg/dL ou $13,51 \pm 0,75$ mmol/L, $n = 7$) quando comparados ao grupo controle ($93,5 \pm 2,5$ mg/dL ou $5,19 \pm 0,14$ mmol/L, $n = 7$). Foi ainda verificado que, os níveis de glicose progrediram para 359 ± 35 mg/dL após o parto, enquanto que nas ratas controles a glicemia permaneceu constante.

O tratamento com STZ induziu, já na primeira semana, o aumento do consumo diário de água e ração, que foi, respectivamente, de $110,7 \pm 4,9$ (DG) vs. $49,3 \pm 1,3$ mL/dia (ND) e de $37,4 \pm 0,8$ (DG) vs. $28,9 \pm 2,3$ g/dia (ND), confirmando um quadro de polifagia e polidipsia. Após a parição, o consumo de água e ração permaneceu significativamente elevado nas ratas DG ($p < 0,0001$, teste t de Student não pareado) quando comparado às ND (Figura 18).

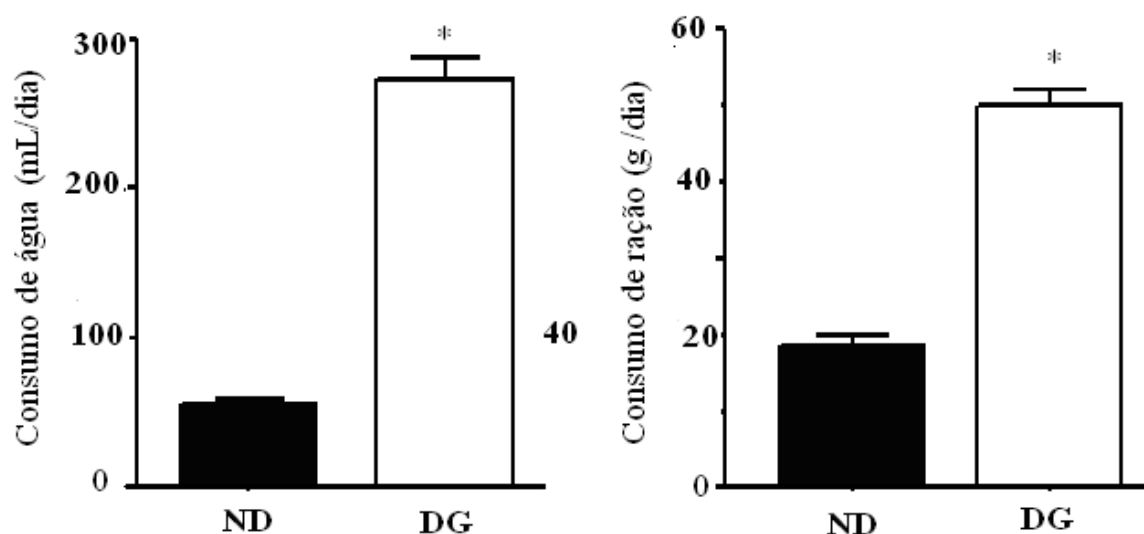


Figura 18 - Consumo diário de água e ração de ratas diabéticas (DG, colunas brancas) e ratas não diabéticas (ND, colunas negras) após 7 dias de parição. Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m; $n = 7$; * $p < 0,0001$ (Teste t de Student não pareado).

2. Efeitos do diabetes gestacional sobre o crescimento ponderal e os parâmetros anatômicos do coração da prole adulta

Para evitar a possibilidade de rejeição, apenas alguns ($n = 5$) animais oriundos da prole de ratas diabéticas (DG) foram pesados ao nascimento, observando-se que seu peso corporal (PC) foi significativamente reduzido ($p < 0,0001$) quando comparado à prole de ratas ND (Figura 19). Uma ANOVA a duas vias, seguida do teste de Tukey mostrou que essa redução de peso foi significativa ($p < 0,001$) em todas as idades estudadas (Figura 20). A relação do peso coração seco/peso corporal (PCS/PC) e a relação do peso coração úmido/peso corporal (PU/PC) não foram modificadas ($p > 0,05$, teste t de Student não pareado) na prole oriunda de fêmeas DG quando comparada a prole das fêmeas ND (Tabela 2).

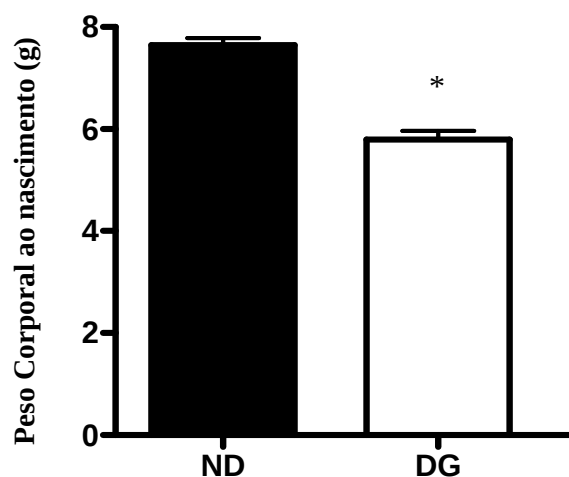


Figura 19 – Peso corporal da prole de ratas diabéticas (DG, colunas brancas) e ratas não diabéticas (ND, colunas negras), ao nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m.; $n = 5$; * $p < 0,0001$ (Teste t de Student não pareado).

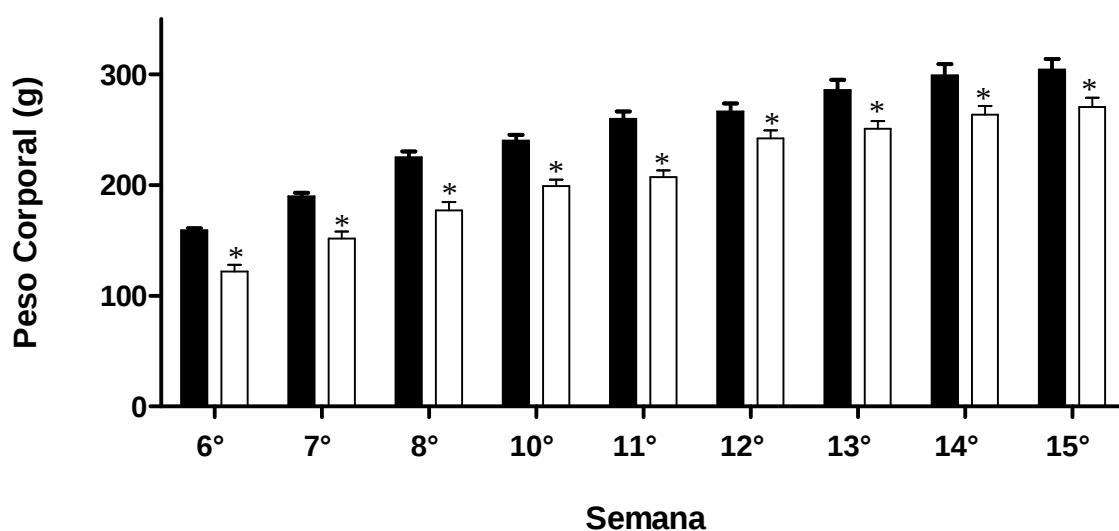


Figura 20 - Efeitos do diabetes gestacional sobre o curso temporal do peso corporal da prole da 6ª semana após o nascimento até 15ª semana. As colunas negras representam a prole submetida ao diabetes gestacional (DG), e as brancas, a prole oriunda de fêmeas não diabéticas (ND). Os valores são expressos como médias $\pm$ e.p.m.; $n = 7$; * $p < 0,001$ (ANOVA a duas vias) seguido de teste de Tukey.

Tabela 2 - Comparação entre os parâmetros anatômicos da prole adulta de animais submetidos ao diabetes gestacional (DG) e a prole de animais não diabéticos (ND)

Parâmetros anatômicos	ND	DG
Peso corporal (g)	304,3 ± 10,2	258,9 ± 7,1*
Peso coração úmido (mg)	869,4 ± 40,7	759,1 ± 29,3
Peso seco (mg)	180,8 ± 5,0	155,3 ± 4,1*
Peso coração úmido/ peso corporal (mg/g)	2,88 ± 0,2	2,93 ± 0,1
Peso coração seco/ peso corporal (mg/g)	0,59 ± 0,0	0,60 ± 0,0

Os valores são expressos como média ± e.p.m ; n = 8; * p < 0,05 (Teste t de Student não pareado)

3. Efeitos do diabetes gestacional sobre as taxas plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL da prole adulta

A tabela 3 mostra que as taxas plasmáticas de glicose, colesterol total e HDL foram similares entre os grupos DG e ND (n = 8). Entretanto, o grupo DG apresentou níveis de triglicerídeos significativamente (p < 0,001) elevados quando comparado ao ND.

Tabela 3 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos da prole adulta de animais oriundos de fêmeas com diabetes gestacional (DG) induzido por estreptozotocina (STZ, 42 mg/kg i.p.) e de fêmeas não diabéticas (ND)

Parâmetros bioquímicos	Grupos	
(mmol/L)	ND	DG
Glicose	5,4 ± 0,2	5,9 ± 0,4
Colesterol total	1,8 ± 0,0	1,6 ± 0,1
Colesterol HDL	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Triglicerídeos	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,3*

Valores representam médias ± e.p.m., n = 8; * p < 0,001 (Teste t de Student não pareado)

4. Efeitos do diabetes gestacional sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca

Os níveis basais de pressão arterial sistólica da prole ($137,6 \pm 14,0$ DG ($n = 7$) vs. $149,2 \pm 9,3$ mmHg ND ($n = 7$)) adulta de animais que foram submetidos ao DG não foram modificados, o mesmo sendo observado para os níveis basais de pressão arterial diastólica ($105,7 \pm 10,8$ DG vs. $113,8 \pm 12,1$ mmHg, ND) e FC (Tabela 4).

Após 40 dias da parição, os valores de pressão arterial média (PAM) foram similares entre as fêmeas (mães) que desenvolveram DG e as não diabéticas, enquanto a FC foi reduzida ($p > 0,05$) nas primeiras.

Tabela 4 - Comparação dos níveis de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) entre fêmeas (mães) com diabetes gestacional (DG) induzido por estreptozotocina (42 mg/kg, i.p.) e não diabéticas (ND), bem como suas proles adultas.

Valores basais	Mães		Prole	
	ND (n = 4)	DG (n = 4)	ND (n = 7)	DG (n = 7)
PAM (mm Hg)	$109,7 \pm 3,2$	$106,9 \pm 3,8$	$123,4 \pm 11,2$	$116,3 \pm 11,6$
FC (b.p.m)	$326 \pm 5,5$	$305,8 \pm 3,9^*$	$373,4 \pm 27,6$	$380,6 \pm 32,8$

Os dados são expressos como valores médios $\pm$ e.p.m.; * $p < 0,05$ (Teste t de Student não pareado).

5. Efeitos do diabetes gestacional sobre a reatividade vascular da prole

A adição de uma concentração submáxima de 60 mM de cloreto de potássio (KCl) ao banho de órgão isolado induziu contração dos anéis de aortas do grupo DG e ND. A contração máxima entre o grupo ND ($0,27 \pm 0,03$ g) e DG ($0,31 \pm 0,02$ g) não foi significativamente diferente. Entretanto, quando a contração foi induzida por NE (1 μ M), a contração máxima foi de $0,45 \pm 0,05$ g vs. $0,32 \pm 0,03$ g para os anéis oriundos do grupo DG e ND, respectivamente. Um teste t de Student não pareado revelou que este valor foi significativamente ($p < 0,05$) maior, demonstrando maior eficácia dos anéis de aorta de animais DG à NE (Figura 21).

O presente estudo mostra que a curva concentração-efeito da NE (1-1000 nM) foi significativamente ($p < 0,05$) deslocada para direita no grupo DG, sugerindo que este grupo apresenta uma resposta α -adrenérgica mais efetiva à NE do que o grupo ND (Figura 22). A adição de Ach (0,1 a 10 μ M) às preparações de anéis de aorta com endotélio intacto, oriundas do grupo DG e ND e pré-contraídas com NE (1 μ M), induziu relaxamento concentração dependente ($p < 0,001$, ANOVA a uma via) (Figura 23).

A contração induzida pela NE foi reduzida pela Ach (10 μ M) para $38,1 \pm 6,9$ % em preparações de aortas do grupo DG ($n = 8$) e $46,7 \pm 3,9\%$ para o grupo ND ($n = 8$), não havendo diferença significativa entre os dois grupos. Entretanto, na concentração de 0,1 μ M de Ach, a inibição da contração produzida por NE é significativamente menor ($p < 0,05$) nas aortas do grupo DG quando comparadas ao grupo ND (Figura 24). Provavelmente, esta diferença está correlacionada com baixas concentrações da Ach.

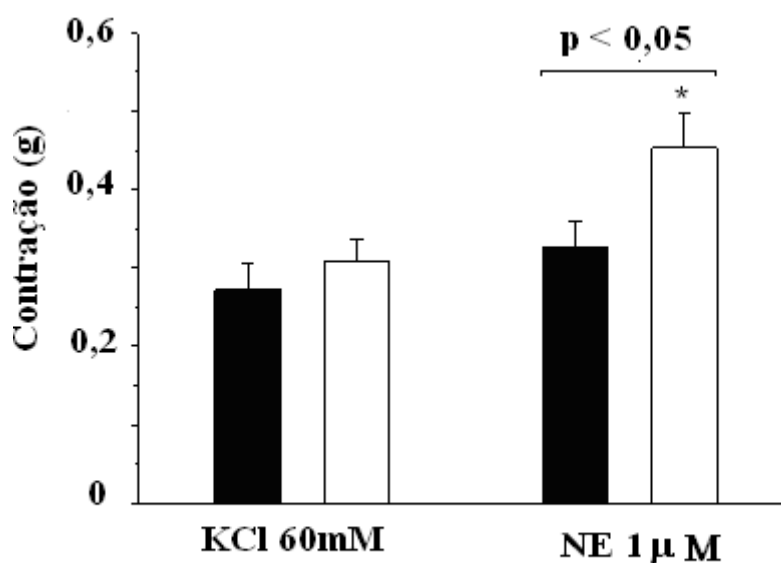


Figura 21 - Contração induzida por 60 mM de K^+ e por 1 μ M de norepinefrina (NE) em anéis de aorta torácica oriundos da prole de ratas com diabetes gestacional (DG, colunas brancas) ($n = 24$) e não diabéticas (ND, colunas negras) ($n = 20$). Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$, teste t de Student não pareado.

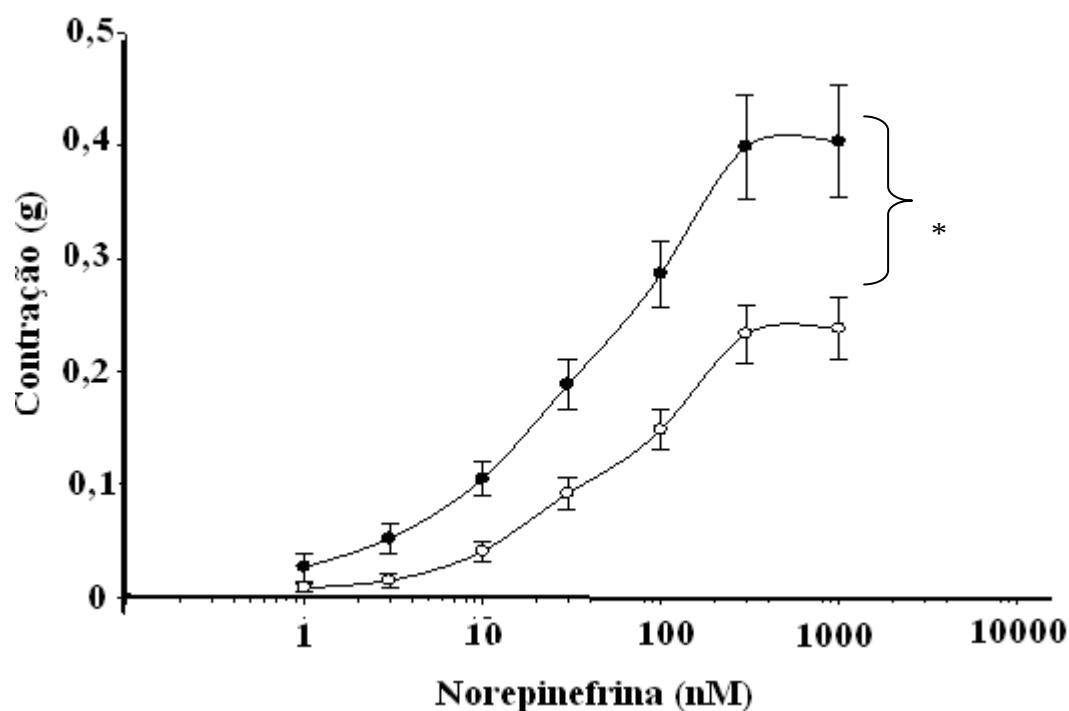


Figura 22- Curva concentração-efeito da norepinefrina (1-1000 nM) induzindo contração em anéis de aorta torácica com endotélio da prole adulta oriunda de mães com diabetes gestacional (DG, n = 24) (●) e mães não diabéticas (ND, n = 20) (○). Os pontos representam os valores médios $\pm$ e.p.m. * $p < 0,001$ (ANOVA duas vias).

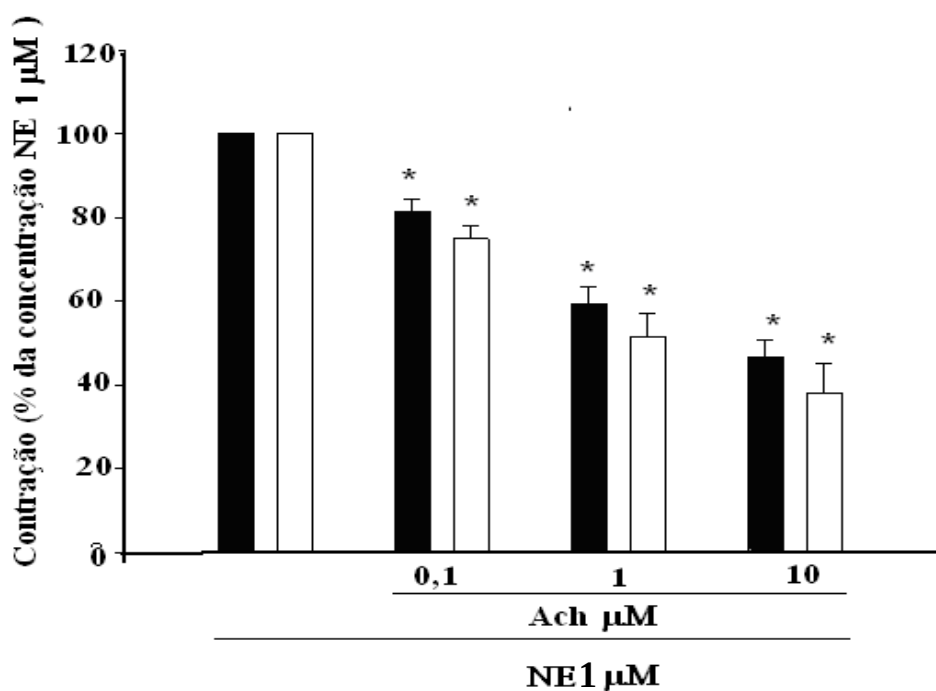


Figura 23 - Concentração-resposta da Acetilcolina (ACh, 0,1 a 10 μ M) em preparações de aorta, obtidas da prole adulta de ratas não diabéticas (ND (n = 20), colunas negras) e de ratas com diabetes gestacional (DG (n = 24), colunas brancas), pré-contráidas com norepinefrina (NE, 1 μ M). A tensão é expressa como porcentagem da contração de NE (1 μ M). * $p < 0,001$ (ANOVA uma via).

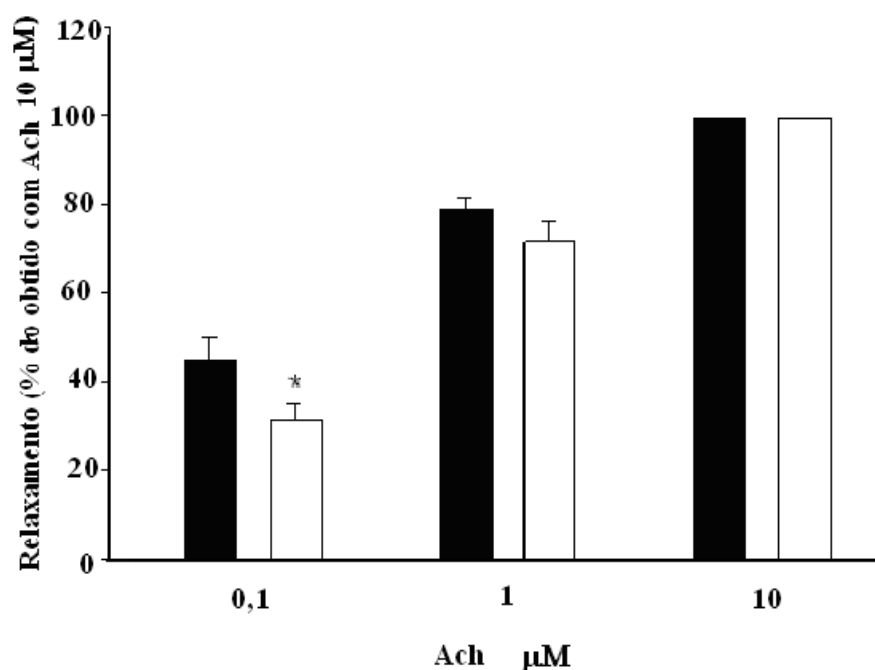


Figura 24 – Concentração resposta da acetilcolina (ACh) induzindo relaxamento sobre preparações de anéis de aorta, obtidas da prole de ratas com diabetes gestacional (colunas brancas, $n = 24$) e não diabéticas (colunas pretas, $n = 20$), pré-contraídas com norepinefrina (NE). A tensão é expressa como porcentagem do relaxamento obtido com ACh 10 μ M. * $p < 0,05$, teste t não pareado.

A adição de concentrações cumulativas (0,1 a 10 nM) de NPS induziu um relaxamento concentração dependente ($p < 0,001$, ANOVA a uma via) tanto em preparações de aorta desprovidas de endotélio oriundas de ratos DG como ND, pré-contraídas com NE. Ainda, pode ser observado que a contração induzida pela NE (1 μ M) foi inibida pelo NPS apenas na concentração de 0,1nM do grupo DG, quando comparado ao ND (Figura 25).

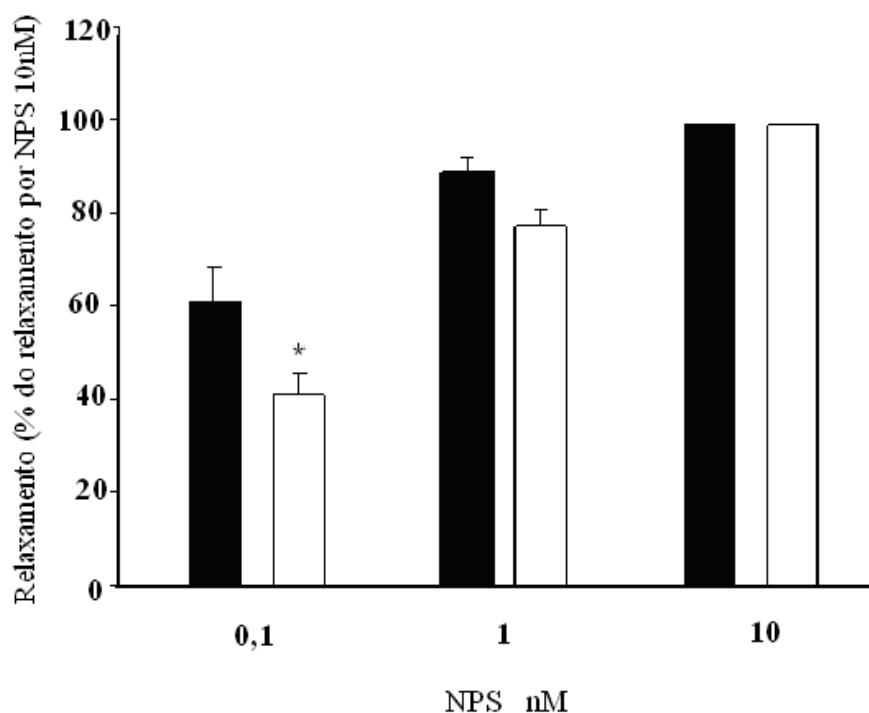


Figura 25 - Efeito concentração-resposta de nitroprussiato de sódio (NPS) sobre preparações de aorta sem endotélio, obtidas da prole de ratas submetidas ao diabetes gestacional (colunas brancas, $n = 24$) e ratas não diabéticas (colunas negras, $n = 20$), pré-contraídas com norepinefrina ($1\mu\text{M}$). A tensão é expressa como porcentagem do relaxamento máximo obtido com NPS (10 nM). Os valores são expressos em média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado).

A Figura 26 mostra que na presença de TEA (5 mM), um bloqueador de canais de potássio, o vasorrelaxamento produzido pela Ach ($0,1\text{ }\mu\text{M}$) foi completamente abolido no grupo ND (parte superior da figura) e reduzido significativamente ($p < 0,05$) no grupo DG (parte inferior da figura). Em ambos, DG e ND, o relaxamento induzido por $1\text{ }\mu\text{M}$ de Ach foi significativamente ($p < 0,05$) reduzido. Efeito similar foi observado quando as preparações de anéis oriundos de ratos ND e DG foram expostas a 4-AP, que é um antagonista dos canais Kv, reduzindo a ação relaxante da Ach $0,1$ e $1\text{ }\mu\text{M}$ (Figura 27).

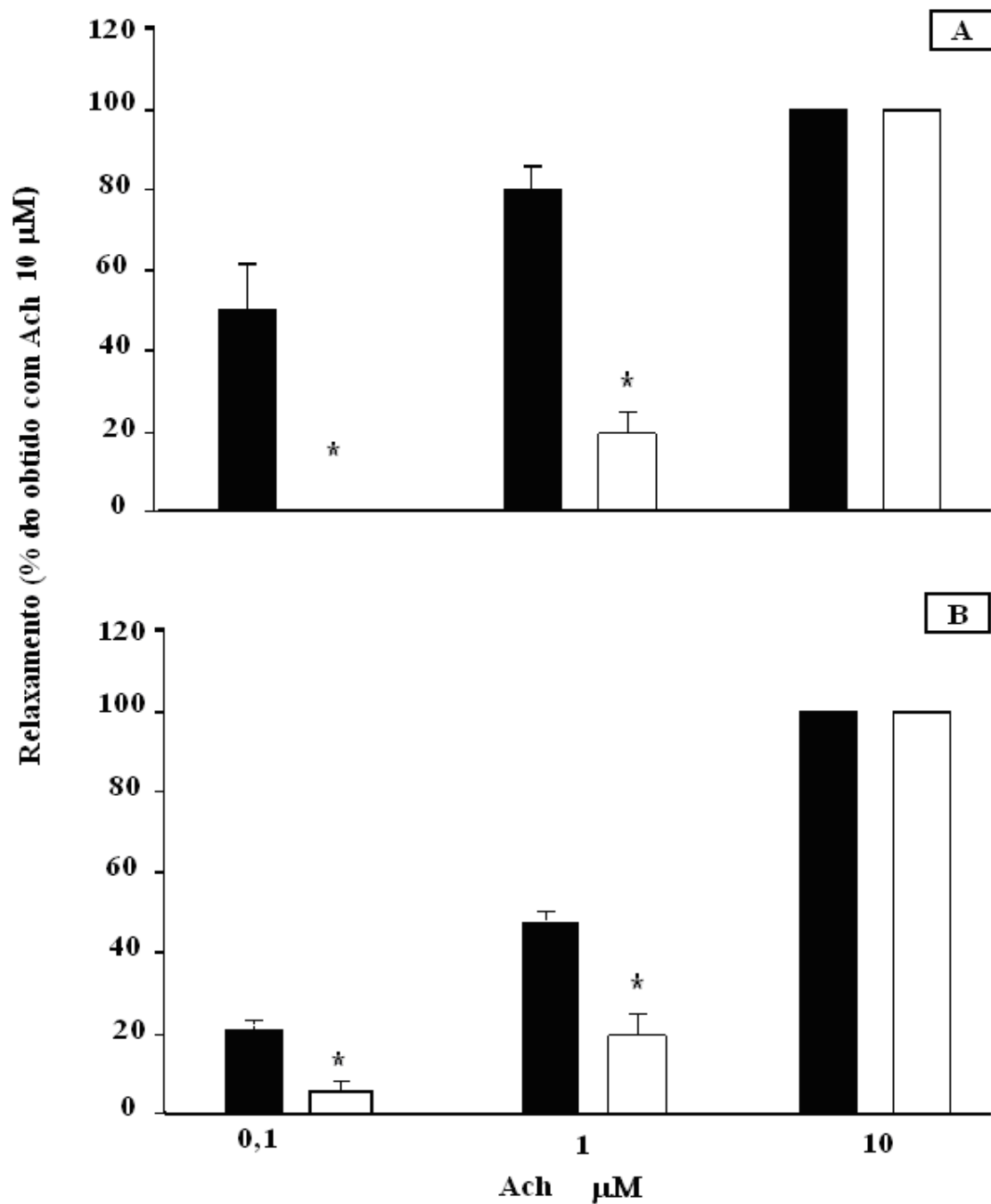


Figura 26 – Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (ACh) em anéis de aorta pré-tratados exclusivamente com acetilcolina (ACh, barras negras) ou com a adição do bloqueador tetraetilamônio (TEA, 5mM, barras brancas), oriundos da prole de ratas não diabéticas (ND) (painel A) e de ratas submetidas ao diabetes gestacional (DG) (painel B). A tensão é expressa como porcentagem do relaxamento obtido com ACh 10 μM . * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado).

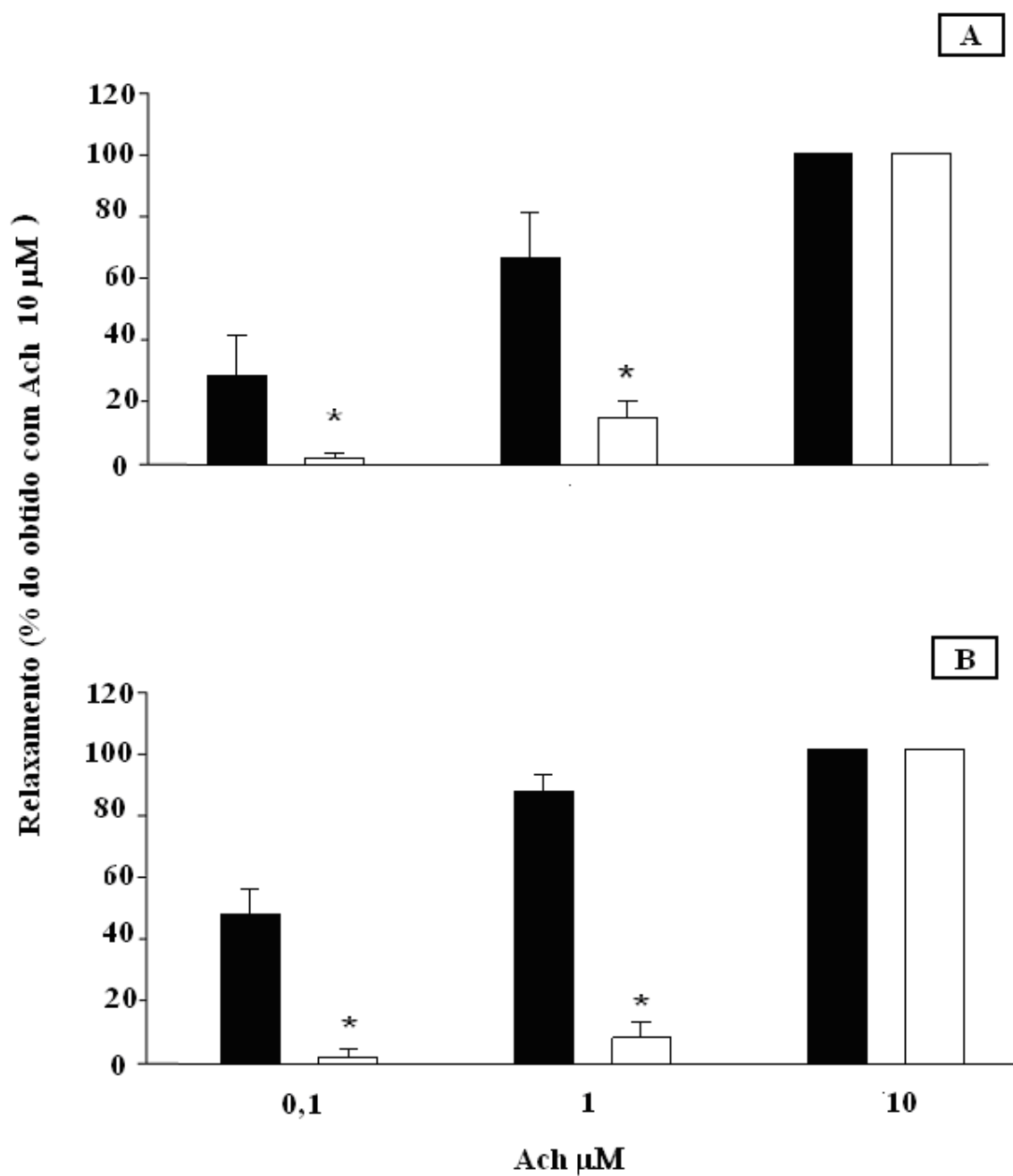


Figura 27 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (ACh) em anéis de aorta pré-tratados exclusivamente com acetilcolina (ACh, barras negras) ou com a adição do bloqueador 4-aminopiridina (4-AP, 3 mM, barras brancas), oriundos da prole de ratos submetidos ao diabetes gestacional (DG) (parte inferior) e ratos não diabéticos (ND) (parte superior). A tensão é expressa como porcentagem do relaxamento obtido com Ach 10 μM . * $p < 0,05$ (teste t de Student não pareado).

Em preparações de aorta oriundas dos animais ND, o efeito vasorrelaxante da Ach na presença da glibenclamida (10 μ M), um bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP, foi reduzido ($26,6 \pm 6,0\%$). Esta redução foi significativa ($p < 0,05$) apenas na concentração de 0,1 μ M de ACh. Na ausência da glibenclamida, a contração induzida por NE foi reduzida ($49,3 \pm 11,9\%$). Já nas preparações de aorta oriundas de ratos DG, o efeito vasorrelaxante da Ach não foi modificado pela presença da glibenclamida (10 μ M) (Figura 28). Na presença de diazóxido (0,1 μ M), um abridor dos canais de potássio sensíveis ao ATP intracelular, o efeito vasorrelaxante da Ach (0,1 e 1 μ M) tanto em anéis de aorta oriundos do grupo ND como DG, foi reduzido significativamente ($p < 0,05$) (Figura 29).

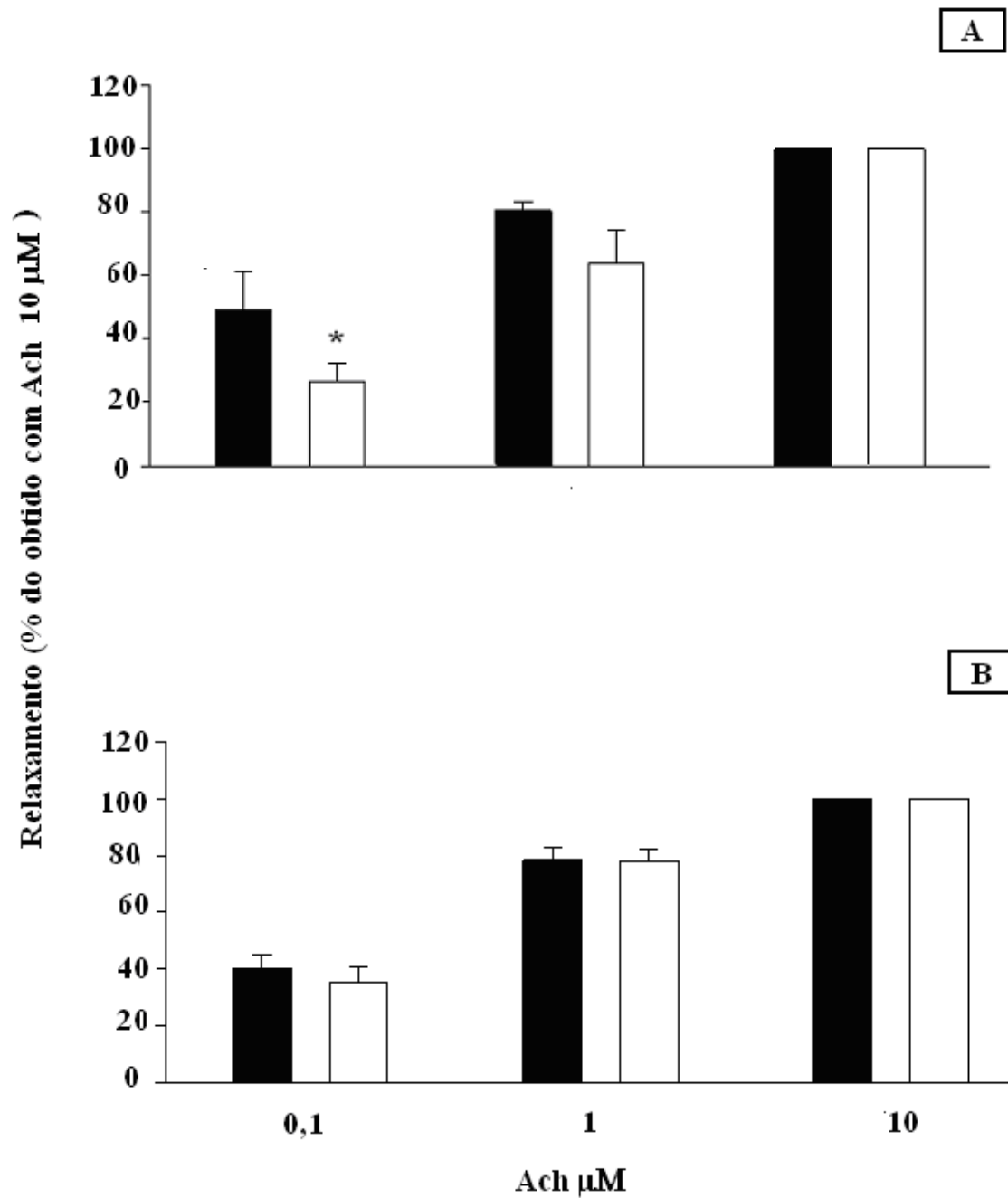


Figura 28 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (Ach) em anéis de aorta pré-tratados exclusivamente com acetilcolina (Ach, barras negras) ou com a adição da glibenclamida (Glib, 10 μM , barras brancas), oriundos da prole de ratas não diabéticas (ND) (painel A) e ratos submetidos ao diabetes gestacional (DG) (parte inferior). A tensão é expressa como porcentagem do relaxamento obtido com Ach 10 μM . $p < 0,05$ (Teste t de Student, não pareado)

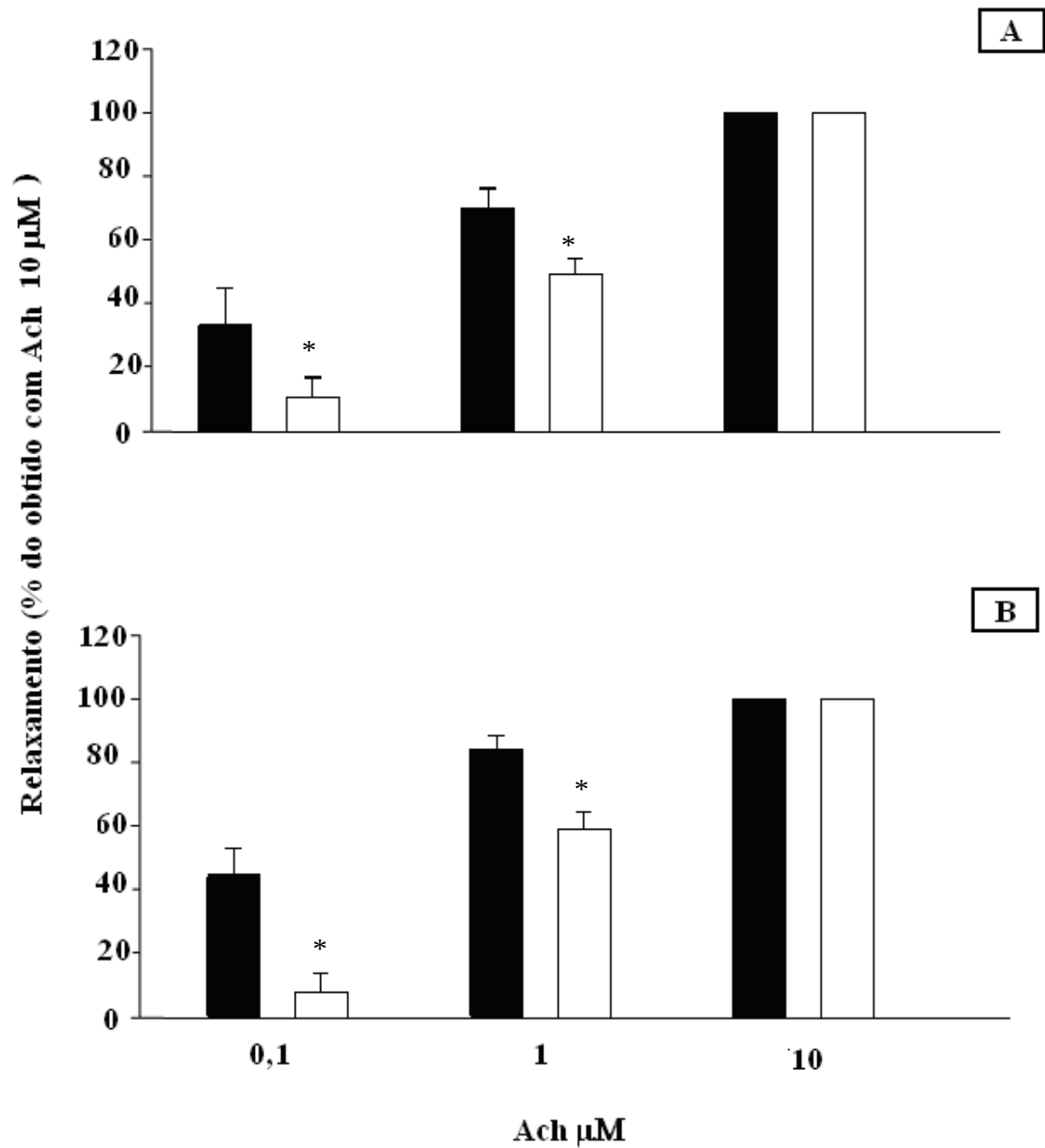


Figura 29 - Efeito vasorrelaxante da acetilcolina (Ach) em preparações de anéis de aorta pré-tratadas exclusivamente com acetilcolina (Ach, barras negras) ou com a adição do diazóxido (Diaz, 100 μM , barras brancas) oriundos da prole de ratos submetidos ao diabetes gestacional (DG) (parte inferior) e ratos não diabéticos (ND) (parte superior). A tensão é expressa como porcentagem do relaxamento obtido com Ach (10 μM). * $p < 0,05$ (teste t não pareado).

V- DISCUSSÃO

A hiperglicemia durante a gestação é associada a conseqüências severas no desenvolvimento do feto podendo levar a distúrbios importantes na vida adulta (HOLEMANS et al., 1991). O DG é prevalente entre várias etnias (DABELEA et al., 2005) aumentando o risco de desenvolvimento de diabetes pós-parto (JOVANOVIC; PETTITT, 2001).

Neste estudo mostramos que o DG induz alterações na vida adulta e que, embora a prole oriunda de mães com DG não tenha apresentado hipertensão nem modificação da frequência cardíaca, a reatividade vascular desses animais está alterada. Esses resultados não são bem estabelecidos na literatura, alguns autores têm demonstrado que animais submetidos ao diabetes durante a gestação desenvolvem hipertensão na vida adulta (WICHI et al., 2005; ROCHA et al., 2005; MAGATON et al., 2007; CANAVAL et al., 2007), porém, outros sugerem que não há modificação (HOLEMANS et al., 1999). É possível que a metodologia empregada para mensurar a PA seja uma das responsáveis por tal divergência. O uso da pletismografia de cauda, por exemplo, uma medida indireta muito utilizada por vários pesquisadores, está sujeito a variação induzida por estresse. Em ratos diabéticos, foi observado um aumento da PA quando a mensuração é realizada pelo método indireto (BUÑAG et al., 1982; HAYASHI et al., 1983; KUSAKA et al., 1987; YAMAMOTO, 1988; GOYAL et al., 2008), enquanto a maior parte dos experimentos que usaram a medida direta verificou que os níveis pressóricos não eram modificados ou eram reduzidos (TOMLINSON et al., 1992 ; BIDANI et al. 2007). Da mesma forma, alguns autores observaram o aumento da PAM (HARTMANN et al., 1988; TAKEDA et al., 1991; BRANDS et al., 1998), enquanto outros verificaram uma diminuição que foi atribuída à disfunção autonômica (LONGO-OLIVEIRA et al., 1999). Maeda et al. (1995) observaram que ratos adultos com cinco dias de diabetes induzida por STZ (65 mg/kg), apresentavam disfunção vagal evidenciada pela redução do barorreflexo, isto é, uma disfunção na resposta taquicárdica diante da queda da PA promovida por NPS. A equipe de Schaan et al. (2004) verificou a ocorrência de bradicardia e hipotensão nos primeiros cinco a sete dias de instalação do diabetes e que após o período de trinta a quarenta dias, a redução da função autonômica apresentava uma correlação negativa com os níveis de glicemia, o que sugeria uma origem metabólica. Outros autores demonstraram que ratos com diabetes induzida por STZ apresentavam redução da PA e da resposta vascular a NE (REBOLLEDO et al., 2001). Rinald (2005) mostra que cinco

semanas após a indução do diabetes com STZ, ocorre alterações no relaxamento vascular dependente do endotélio, hiperatividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) e aumento da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ da membrana plasmática (PMNaCa), o que poderia explicar a redução da PA.

Em nosso trabalho, a dose escolhida de STZ (42 mg/kg, via i.p) promoveu no 14º dia uma glicemia entre 200 e 300 mg/dL, considerada como diabetes moderado (CALUWAERTS et al., 2003), que evoluiu para diabetes severa (359 ± 35 mg/dL) após a parição. Foi observado ainda polifagia, poliúria (dados não mostrados) e perda de peso das gestantes confirmando o quadro de diabetes. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (KANDEL; MCGEE, 1979; TOMLINSON et al., 1992 ; SCHANN et al., 2004). Verificamos ainda que o nível elevado da glicemia na gestação comprometeu a viabilidade fetal, observado pelo índice de mortalidade elevado entre as fêmeas prenhas (cerca de 30%). Nos primeiros dias após o nascimento, o índice de mortalidade dos filhotes também foi elevado, e nós atribuímos o fato à ausência do aleitamento e ao canibalismo praticado pelas mães. Alguns autores têm demonstrado que o diabetes gestacional compromete a termorregulação (GUIMARÃES et al., 2006), o que também poderia contribuir para a mortalidade da prole. Os animais sobreviventes tiveram o crescimento comprometido, observando-se além do baixo peso ao nascimento a manutenção deste durante toda a fase de crescimento até os 120 dias de idade. Nossos dados são corroborados por outros estudos que mostram que aos 30 e aos 80 dias de nascimento, animais oriundos de fêmeas diabéticas apresentaram peso corporal menor que os de fêmeas não diabéticas (HOLEMANS et al, 1999; WICHI et al, 2005), indicando uma provável alteração no metabolismo destes ratos. Outros autores não verificaram alteração no peso ao nascimento (MAGATON et al, 2007; FUJISAWA et al., 2007). Em humanos, é relatado com freqüência que os neonatos de mães diabéticas são macrossômicos (HADDEN, 2008), enquanto baixo peso ao nascimento, desproporção no tamanho da cabeça, peso da placenta, são marcadores de nutrição inadequada durante fases da gestação (BARKER, 1997). O diabetes gestacional é associado ainda ao aborto espontâneo, má formação congênita e elevada mortalidade perinatal (TRAVERS et al., 1989; CARRAPATO et al., 2003).

Embora seja crescente o número de autores que mostram a relação hiperglicêmica no ambiente fetal a doenças cardíacas, em nossos resultados não foi observado hipertrofia ou atrofia cardíaca, sugerindo que anatomicamente o coração foi preservado. Outros estudos sugerem que, na condição experimental de gestação hiperglicêmica, os neonatos apresentam

hipertrofia cardíaca e defeito no septo ventricular (MENEZES et al. 2001; SANTOS-JUNIOR 2006), e que quando a hiperglicemia é de longa duração, desde antes da concepção, os neonatos apresentam uma atrofia cardíaca (SANTOS-JUNIOR, 2006). Em humanos, verifica-se que a resistência à insulina, hipertrigliceridemia e hiperglicemia aumentam os fatores de risco para doenças cardiovasculares, embora, a relação precisa entre esses fatores e o desenvolvimento dessas doenças não sejam esclarecidos. As taxas de insulina plasmática e triglicerídeos são elevadas ao nascimento em alguns modelos animais de diabetes gestacional, apresentando intolerância à glicose aos 70 dias de idade (LOPEZ-SOLDADO et al., 2003). Nós não verificamos, em nosso estudo aos 120 dias de idade, alterações nos níveis de colesterol ou glicose, mas a taxa de triglicerídeo foi 3,5 vezes maior que a prole oriunda de mães normoglicêmicas, o que poderia estar vinculada à disfunção endotelial. Esses dados são corroborados por outros autores (AERTS et al., 1990 ; HOLEMANS et al., 1999). Algumas das controvérsias nos níveis de glicemia, triglicerídeos, colesterol e glicose são provavelmente consequência da dose empregada de STZ e da duração da hiperglicemia (WICHI et al., 2005; CAVANAL et al., 2007).

O nível elevado de triglicerídeos na prole submetida ao DG poderia favorecer a disfunção endotelial. De fato, os estudos que realizamos *in vitro*, utilizando as aortas da prole de ratas diabéticas, mostraram que há um aumento da resposta vasoconstritora a NE, assemelhando-se aos resultados vistos por Holemans et al. (1999) e Rocha et al. (2005) em preparações de artéria mesentérica.

Em preparações de aorta, o relaxamento dependente do endotélio é mediado pelo NO, sendo documentado que no diabetes há uma redução da sua disponibilidade.

Nossos resultados demonstram que o efeito relaxante promovido pela acetilcolina em anéis de aorta oriundos da prole submetida ao DG é reduzido, sugerindo que a atividade dos canais de K^+_{ATP} possa estar envolvida nesta redução. Também demonstramos que o relaxamento independente do endotélio (em resposta ao NPS) foi atenuado, mas que a vasodilatação induzida por concentrações mais elevadas de Ach ou de NPS não foi alterada, sugerindo que a diminuição na resposta da aorta aos agentes vasodilatadores ocorre apenas em pequenas concentrações destes agentes porque as mudanças promovidas no vaso pelo diabetes foram sutis.

Holemans et al. (1999), relataram que em preparações de artéria mesentérica oriunda da prole adulta de animais diabéticos também ocorre uma redução do relaxamento a Ach, ocorrendo também diminuição do relaxamento a bradicinina e aumento da sensibilidade a NE. Essa redução foi atribuída à alteração da síntese de vasodilatadores derivados do

endotélio, não sendo observado redução na sensibilidade e no relaxamento máximo para acetilcolina quando da presença de ciclooxigenases ou do bloqueio da óxido nítrico síntase e guanilato ciclase, sugerindo que a prostaciclina/óxido nítrico é responsável pelo defeito no relaxamento dependente do endotélio, e não o fator hiperpolarizante derivado do endotélio.

Rocha et al. (2005) mostraram uma redução da resposta das arteríolas mesentéricas a Ach e a bradicinina, embora o relaxamento ao NPS não fosse comprometido. Esses autores sugeriram que como a capacidade de vasodilatação está ligada ao endotélio, o DG poderia causar uma redução da síntese e/ou biodisponibilidade do NO diminuindo a vasodilatação dependente de endotélio. O estudo de Canaval et al. (2007) corrobora esta hipótese através da quantificação do NO utilizando um marcador fluorescente denominado 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2) que mostrou uma redução da produção de NO. Essa produção de NO era aumentada quando estimulada por Ach e bradicinina, mas esse aumento era significativamente menor do que em animais oriundos de mães normoglicêmicas.

Há poucos estudos sobre as repercussões do diabetes gestacional na reatividade vascular da prole adulta. A hiperglicemia prolongada é reconhecida como um fator importante na patogênese da vasculopatia induzida pelo diabetes, sendo associada ao aumento do estresse oxidativo, à glicação de proteínas, lipoproteínas, apolipoproteínas que acumulados aumentam o tônus vascular, à permeabilidade vascular e ao remodelamento (LAAKSO, 1999; GRUNDY et al., 1999 ; TOOKE, 1995; PASTON; TAYLOR, 1995 ; RAHMAN et al., 2007).

A maioria dos estudos existentes na literatura é realizada em ratos diabéticos e tem demonstrado um aumento da contratilidade da aorta a vasoconstrictores (MAJITHIYA et al., 2005, NOBE et al., 2002; ABEDE et al., 1990) e comprometimento do relaxamento induzido por ACh (ABEDE et al., 1990; DE VRIESE et al., 2000, MAJITHIYA et al., 2005). Alguns estudos mostraram que há uma produção aumentada de O_2^- e H_2O_2 pelo endotélio da aorta de ratos diabéticos que está envolvida na indução da disfunção endotelial (PIEPER et al., 1997).

Nas células da musculatura lisa, o NO produz vasodilatação por ativação de alguns canais, dentre eles os canais de potássio (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006), que quando são abertos ou ativados aumentam efluxo de K^+ produzindo hiperpolarização ou repolarização do MLV (NELSON; QUAYLE, 1995). Para investigar o papel dos canais de K^+ nos efeitos induzidos pela Ach na preparação de aorta da prole DG e ND, nós utilizamos o TEA (5 mM), um inibidor não seletivo do canal de K^+ . Os resultados mostraram que nos anéis de aorta da

prole ND, o TEA inibiu o efeito vasorrelaxante da Ach e reduziu o efeito inibitório da Ach sobre a contração da NE em anéis da prole DG. Estes resultados sugerem que a abertura de canais para K^+ está envolvido no vasorrelaxamento induzido pela Ach. Quando os anéis de aorta foram pré-tratados com 4-AP, reduziu o efeito vasorrelaxante da Ach, sugerindo que a atividade do canal de potássio regule o potencial de membrana e o tônus vascular tanto nos anéis de aorta da prole DG quanto ND.

O pré-tratamento com glibenclamida, um inibidor de canais de K^+ sensível a ATP (K_{ATP}), reduziu o efeito vasorrelaxante da Ach nas preparações de aorta oriundas da prole ND. Entretanto, não teve efeito no relaxamento induzido pela Ach nas preparações oriundas da prole DG, sugerindo assim que o canal K_{ATP} exerça um papel importante no controle do tônus vascular da prole ND e que sua ativação está alterada nos anéis de aorta da prole DG. Quando os anéis de aorta foram pré-tratados com diazóxido, um abridor dos canais K_{ATP} , o efeito vasorrelaxante induzido pela Ach foi reduzido tanto em anéis oriundos de ND como em DG. É possível que a baixa responsividade encontrada nos anéis de aorta do grupo DG esteja associada a uma redução na ativação dos canais K_{ATP} na vida adulta. Assim, a Ach não induz a ativação dos canais K_{ATP} nos tecidos de animais expostos ao diabetes gestacional. As razões para este fato, bem como o mecanismo envolvido nessa redução de responsividade vascular, necessita ser melhor estudada.

Os canais K_{ATP} podem ser inibidos pela estimulação da via da PKC ou pela inibição da via da PKA, que normalmente promove a vasodilatação. A glibenclamida inibe a vasodilatação da adenosina provavelmente pela inibição da PKA (KLEPPISCH et al., 1995), como também atua bloqueando diretamente estes canais promovendo uma diminuição na vasodilatação dependente do endotélio. O mecanismo sobre como a PKC inibiria os canais K_{ATP} é ainda desconhecido, mas é sugerido que a PKC poderia fosforilar os canais K_{ATP} e alterar a sua cinética de abertura (CHRISOBOLIS; SOBEY, 2002). O estresse metabólico produzido pela hiperglicemia pode causar disfunção na ativação dos canais K_{ATP} mediante uma ativação excessiva de PKC que exerce uma ação inibitória nestes canais (KAWANO et al., 2008). Foi observado que a RI também altera a função dos canais de K_{ATP} nas artérias cerebrais, promovendo uma redução na vasodilatação dependente de endotélio de ratos que também apresentam hipertrigliceridemia (ERDOS et al., 2002).

Estudos recentes têm apresentado evidências que parecem corroborar a hipótese de que alterações no meio intra-uterino podem ter impacto sobre o desenvolvimento do feto por modificar a expressão genética de células. Os efeitos promovidos na prole dependeriam da

fase (diferenciação, proliferação ou maturação funcional) em que as células teriam sido submetidas ao distúrbio materno. Alterações permanentes no fenótipo da prole sugerem que a adversidade do meio intra-uterino induz mudanças estáveis na expressão gênica. Mecanismos epigenéticos parecem providenciar um novo nível de controle da transcrição regulando a expressão do gene. Diferentes mecanismos sustentam modificações epigenéticas em mamíferos tais como o RNA “silencioso” (siRNA ou micro RNA), metilação do DNA na citosina-guanina dinucleotídeo localizado na região promotora de genes e modificações pós translacionais da histona (acetilação, metilação e fosforilação), modulando a estrutura da cromatina.

A sensibilidade para modificações epigenéticas parece estender-se além do período embrionário, que foi originalmente proposto como o período no qual o gene poderia ser sensível ao ambiente, sendo relatado que o estresse durante o período de lactação em ratas altera a metilação do DNA dos jovens lactentes (SIMMONS, 2007).

VI - CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que o diabetes gestacional induzido pela administração de estreptozotocina (42 mg/kg), induz baixo peso ao nascimento, que não está associado a hipertensão na vida adulta, mas levou a mudanças na reatividade vascular.

Níveis elevados de triglicerídeos associados à redução da atividade dos canais de K_{ATP} contribuem para diminuir a efetividade da acetilcolina em relaxar os anéis de aorta oriundos de animais submetidos ao diabetes gestacional e para aumentar a contratilidade da aorta à norepinefrina, o que poderia contribuir para uma elevação da pressão arterial.

.

.

.

.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACI, A.; OĞUZHAN, A.; KAHRAMAN, S.; ERYOL, N. K.; UNAL, S.; ARINÇ, H.; ERGIN, A. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. **Circulation**, v. 99, p. 2239-42, 1999.

ABEDE, W.; MACLEOD, K. M. Enhanced arterial contractility to noradrenaline in diabetic rats is associated with increased phosphoinositide metabolism. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.69, p. 955-361, 1991.

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

AERTS, L.; HOLEMANS, K.; VAN, A. F.A. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 6, p.147-146, 1990.

AIELLO, E. A.; MALCOLM, A. T.; WALSH, M.P.; COLE, W. C. β -Adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K_1 channels of vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. H448-H459, 1998.

AIELLO, E. A.; WALSH, M. P., COLE, W. C. Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K_1 current in rabbit vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 268, p. H926-H934, 1995.

AKIYAMA, N.; OKUMURA, K.; WATANABE, Y.; HASHIMOTO, H.; ITO, T.; OGAWA, K.; SATAKE, T. Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts: role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 38, p. 231-236, 1989.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. **Gestational Diabetes**. Practice Bulletin no. 30. Washington, 2001.

AMIR, K; FREUND, N.; VILAR, J.; MERLET- BNICHOU, C.; LELIEVRE-PEGORIER, M. Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. **Diabetes**, v. 48, p. 2240-2245, 1999.

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

ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F. M. Correlating structure and function in ATPsensitive K_1 channels. **Trends Neurosci.**, v. 21, p. 288-294, 1998.

ASHTON, N. Perinatal development and adult blood pressure. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 731-40, 2000.

BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. A view of $\text{sur/K}_{\text{IR6.X}}$, K_{ATP} channels. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 667-687, 1998.

BAILEY, C. J.; FLATT, P. R. Model for testing new hypoglycaemia drugs. In: BAILEY, C. J.; FLATT, P. R. (Org.). **New antidiabetic drugs**. London: Smith Gordon, 1990. p. 65-82.

BAKER, H. J.; WEISBROTH, S. H. Taxonomy and genetics. In: Robinson, R. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press editors, 1979. p.42.

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

BARKER, D. J. P.; GLUNKMAN, P. D.; GODFREY, K. M., HARDING, J. E.; OWENS, J. A.; ROBINSON, J. S. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v. 341, p. 938-941, 1993.

BARKER, D. J. P.; WINTER, P. D.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S. J. The relation of head size and thinness at birth to death from cardiovascular disease in later life. **BMJ**, v. 306, p. 422-426, 1993.

BENNETT, T.; FARQUHAR, I. K.; HOSKING, D. J.; HAMPTON, J. R. Assessment of methods for estimating autonomic nervous control of the heart rate in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 27, p. 1167-1174, 1978.

BIDANI, A. K.; PICKEN, M.; HACIOGLU, R.; WILLIAMSON, G.; GRIFFIN, K. A. Spontaneously reduced blood pressure load in the rat streptozotocin-induced diabetes model: potential pathogenetic relevance. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, p. F647-454, 2007.

BYRNE, M. M.; STURIS, J.; CLEMENT, K. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. **J Clin Invest**, v. 93, p. 1120-1130, 1994.

BYRNE, M. M.; STURIS, J.; FAJANS, S. S. Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. **Diabetes**, v. 44, p. 699-704, 1995.

BYRNE, M. M.; STURIS, J.; MENZEL, S. Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and non diabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. **Diabetes**, v. 45, p. 1503-1510, 1996.

BOHR, D. F. Vascular smooth muscle: dual effect of calcium. **Science**, v. 139, p. 597-599, 1963.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 59, p. 607-688, 1979.

BOND, H. K.; HAMILTON, R. J.; BALMENT, J.; DENTON, A. J.; FREEMONT, H. O.; GARLAND, J. D. ; BRANDS, M. E.; FITZGERALD, S. M. Acute endothelium-mediated vasodilation is not impaired at the onset of diabetes. **Hypertension**, v. 32, p. 541-547, 1998.

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

- BONEV, A. D.; NELSON, M. T. Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. **J Gen Physiol.**, v. 108, p. 315-23, 1996.
- BLOOM, D.; McCALDEN, T. A.; ROSENDORFF, C. The effects of hypercholesterolaemic plasma on vascular sensitivity to noradrenaline. **Br. J. Pharmacol.**, v. 54, p. 421-427, 1975.
- BRAYDEN, J. E.; QUAYLE, J. M.; STANDEN, N. B. ; NELSON, M. T. Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. **Blood Vess.**, v. 28, p. 174-53, 1991.
- BUÑAG, R. D.; TOMITA, T.; SARARI, S. Streptozotocin diabetic rats are hypertensive despite reduced hypothalamic responsiveness. **Hypertension**, v. 4, p. 556-565, 1982.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 30-40, 2001.
- CAMPBELL, D. M.; HALL, M. H.; BARKER, D. J., CROSS, J., SHIELL, A. W.; GODFREY, K. M. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 103, p. 273-80, 1996.
- CALUWAERTS, S.; HOLEMANS, K.; VAN BREE, R.; VERHAEGHE, J.; VAN ASSCHE, F. A. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes Mellitus? **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 10, p. 216-21, 2003.
- CARRAPATO, G. The offspring of gestational diabetes. **J. Perinat. Méd.**, v. 31, p. 5 –11, 2003.
- CARVALHO, M. H. C; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e Resistência à insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 304-312, 2006.
- CAVANAL, M. F.; GOMES, G. N.; FORTI, A. L.; ROCHA, S. O.; FRANCO, M. C.; FORTES, Z. B.; GIL, F. Z. The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in the offspring from diabetic mothers. **Pediatr. Res.**, v. 62, p. 145-50, 2007.
- CATALANO, P. M.; TYZBIR, E. D.; WOLFE, R. R.; CALLES, J.; ROMAN, N. M., AMINI, S. B. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 60-67, 1993.
- CHANDY, K. G.; WILLIAMS, C. B.; SPENCER, R. H.; AGUILAR, B. A.; GHANSHANI, S.; TEMPEL, B. L.; GUTMAN, G. A. A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. **Science**, v. 247, p. 973-5, 1990.
- CHANG, K. S. K.; LUND, D. D. Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 18, p. 617-624, 1986.
- CHO, N. H.; SILVERMAN, B. B.; RIZO, T. A.; METZGER, B. E. Correlations between the intrauterine metabolic environment and blood pressure in adolescent offspring of diabetic mothers. **J. Pediatr.**, v.136, p. 587-592, 2000.

- CLEMENT, K.; VAISSE, C.; MANNING, B. J. Genetic variation in the beta3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 352-354, 1995.
- COOPER, M. E.; BONNET, F.; OLDFIELD, M.; JANDELEIT-DAHME, K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. **Am J Hypertens.**, v. 14, p. 475-486, 2001.
- COWLEY, J. R.; LIARD, J. F.; GUYTON, A. C. Role of the baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. **Circ. Res.**, v. 32, p. 564-576, 1973.
- CRIBBS, L. L. T-type Ca^{++} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, p. 221-230, 2006.
- CRIJNS, F. R.; STRUIJKER BOUDIER, H. A.; WOLFFENBUTTEL, B. H. Arteriolar reactivity in conscious diabetic rats: influence of aminoguanidine treatment. **Diabetes**, v. 47, p. 918-923, 1998.
- CSANYI, G.; LEPRAN, I.; FLESCH, T.; TELEGDY, G.; SZABO, G.; MEZEI, Z. Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. **Pharmacol. Reports**, v. 59, p. 447- 455, 2007.
- DABELEA, D.; SNELL-BERGEON, J.K.; HARTSFIELD, C.L. ; BISCHOFF, K.J. ; HAMMAN, R.F.; MCDUFFIE, R.S. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM) over time and by birth cohort: Kaiser Permanente of Colorado GDM Screening Program. **Diabetes Care**, v. 28, p.579–584, 2005.
- DAMASCENO, D. C.; VOLPATO C. T.; CARLDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reprod. Science**, v. 72, p. 235-244, 2002.
- DANEV, S.; NIKOLOVA, R.; KERKOVSKA, M.; SVETOSLAVOV, S. Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. **Cent. Eur. Publ. Health**, v. 5, p. 143-146, 1997.
- DEVRIESE, A. S. ; VERBEUREN, T. J. ; VANDEVOORDE, J.. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 963-974, 2000.
- DIEDERICH, D; SKOPEC, J.; DIEDERICH, A.; DAI, F. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. 1153-1161, 1994.
- EDWARDS, B; DORA, K. A.; GARDNER, M. J.; GARLAND, D. J.; WESTON, A. H. K^{+} is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 96, p. 269-272, 1998.
- EICHLER, I.; WIBAWA, J.; GRGIC, I; KNORR, A.; BRAKEMEIER, S.; PRIES, A. R.; HOYER, J.; KOHLER, R. Selective blockade of endothelial Ca^{2+} -activated small- and intermediate-conductance K^{+} -channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 138, p. 594- 601, 2003.

ECKBERG, D. L.; HARKINS, S. W.; FRITSCH, J. M.; MUSGRAVE, G. E.; GARDNER, D. F. Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart period in healthy subjects and diabetic patients. **J. Clin. Invest.**, v. 78, p. 366-374, 1986.

EL AOUI, S.; GENDRE, P.; SENNOUNE, S. R.; RIGOARD, P.; MAIXENT, J. M.; GRIENE, L. A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (*Psammomys obesus*). **Cell Mol. Biol.**, v. 21, p. OL943-53, 2007. Suplemento.

ELSNER, M.; GULDBAKKE, B. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetology**, v. 49, p. 1528-33, 2000.

ERDÖS, B.; MILLER, A. W.; BUSIJA, D. W. Alterations in KATP and KCa channel function in cerebral arteries of insulin-resistant rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 283, p. H2472-7, 2002.

ERIKSSON, U.; JANSSEN, L. Diabetes and pregnancy: Decreased blood flow and disturbed fetal development in the rat. **Pediatr. Res.**, v. 18, p. 735- 738, 1984.

ESCHWEGE, E.; RICHARD J. L.; THIBULT, N. Coronary Heart disease mortality in relation with Diabetes, Blood glucose and plasma insulin levels. The Paris prospective study, ten years later. **Horm. Metab. Res.**, v. 15, p. 41-46, 1985. Suplemento.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. **Q. J. Med.**, v. 49, p. 95-108, 1980.

EWING, D. J.; MARTYN, C. N.; YOUNG, R. J.; CLARKE, B. F. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. **Diabetes Care**, v. 8, p. 491-8, 1985.

FEIN, F. S.; MILLER, B.; FLORE8, M.; MORTON, E. Myocardial adaptation to chronic propranolol therapy in diabetic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 17, p. 846-853, 1991.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; HONG, H.; STUEHR, D. J. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **J. Med. Chem.**, v. 36, p. 491-496, 1993.

FELETOU, M.; MOREAU, N.; DUHAULT, J. Vascular responsiveness in young, diabetic, and aging hyperinsulinemic rats. **Life Sci.**, v. 54, p. 1801-13, 1994.

FIORETTO, P.; STEFFES, M. W.; SUTHERLAND, D. E.; GOETZ, F. C.; MAUER, M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 69-75, 1998.

FLYNN, E. R. M.; BRADLEY, K. N.; MUIR, T. C.; MACCARRON, J. G. Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 36411-8, 2001.

FRANKEL, B. J.; HEDLT, A. M.; GERRISTENS, G. C.; GRODSKY, G. M.; Insulin, glucagon, and somatostatin release from the prediabetic Chinese hamster. **Diabetiol.**, v. 27, p. 387-391, 1984.

FUJISAWA, T.; IKEGAMI, H.; YAMATO, E. Association of Trp64Arg mutation in the β 3-adrenergic receptor with NIDDM and body weight gain. **Diabetologia**, v. 39, p. 349-352, 1996.

FUJISAWA, Y.; NAKAGAWA, Y.; REN-SHAN, L.; OHZEKI, T. Streptozotocin-induced diabetes in the pregnant rat reduces 11 beta-hydroxysteroid deshydrogenase type 2 expression in placenta and fetal kidney. **Life Sciences**, v. 75, p. 2805-2797, 2004.

FUJISAWA, Y.; NAKAGAWA, Y.; LI, R-S.; LIU, Y-J.; OHZEKI, Y. 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, p. 724-731, 2007.

FULLER, J.; SHIPLEY, M.; ROSE, Y., JARRETT, R. J.; KEEN, H. Coronary heart disease and impaired glucose tolerance. **Lancet**, v. 1, p.1374-1376, 1980 .

FUKUDA, N.; HU, W. Y.; TENG, J.; CHIKARA, S.; NAKAYAMA, M.; KISHIOKA, H.; KANMATSUSE, K. Troglitazone inhibits growth and improves insulin signaling by suppression of angiotensin II action in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v. 163, p. 229-39, 2002.

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 165-194, 1995.

FURCHGOTT, R. F; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 228, p. 373-376, 1980.

GANGULY, P. K.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, K. S.; INNAS, I. R.; DHALLA, N. S. Norepinephrine storage, distribution, and release in diabetic cardiomyopathy. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. E734-E739, 1987.

GARCIA-CARDENA, G.; MARTASEK, P.; MASTERS, B. S.; SKIDD, P. M.; COUET, J.; LI, S. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 5437-40, 1997.

GAUGUIER, D; BIHOREAU, M. T.; KTORZA, A.; BERTHAULT, M. F.; PICON, L. Inheritance of diabetes mellitus as consequence of gestational hyperglycemia in rats. **Diabetes**, v. 39, p. 734-739, 1990.

GJESSING, H. J.; REINHOLD, B.; PEDERSEN, O. The effect of chronic hyperglycemia on the islet β -cell responsiveness in newly diagnosed type 2 diabetes. **Diabetes Med.**, v. 9, p. 601-604, 1992.

GOYAL, B. R.; MESARIYA, P.; GOYAL, R. K.; MEHTA, A. A. Effect of telmisartan on cardiovascular complications associated with streptozotocin diabetic rats. **Mol Cell Biochem.**, v. 314, p. 123-31, 2008.

GRUNDY, S. M.; BENJAMIN, I. J.; BURKE, G .L.; CHAIT, A.; ECKEL, R. H.; HOWARD, B. V.; MITCH, W.; SMITH, S. C. J.; SOWERS, J. R. Diabetes and cardiovascular disease: a

statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 100, p. 1134-1146, 1999.

GUILLAUSSEAU, P. J.; MASSIN, P.; CHARLES, M. A. Glycaemic control and development of retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a longitudinal study. **Diabetic Medicine**, v. 15, p. 151-155, 1998.

GUILLAUSSEAU, P. J.; TIELMANS, D.; VIRALLY-MONOD, M.; ASSAYAG, M. Diabetes : from phenotypes to genotypes. **Diabetes Metab.**, v. 23, p. 14-21, 1997.

GUIMARÃES, A. F.; MARTINS, C. M.; LUZ, J. Impact of maternal diabetes mellitus on the thermoregulation of the offspring. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 114, p. 549-54, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Visão Geral da Circulação. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier, 11^{ed}, 2006. p. 147-155.

HADDEN, D. R. Prediabetes and the big baby. **Diabet. Med.**, v.25, p. 1-10, 2008.

HAKARI ET, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and function in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p. 157-230, 1997.

HALES, C. N.; BARKER, D. J.; CLARK, P. M. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, v. 303, p.1019-1022, 1991.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br. Med. Bull.**, v. 60, p. 5-20, 2001.

HADDEN, D. R. Prediabetes and the big baby. **Diabet. Med.**, v. 25, p. 1-10, 2008.

HARTMANN, J. F.; SZEMPLINSKI, M.; HAYES, N. S.; KEEGAN, M. E.; SLATER, E. E. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, lisinopril, on normal and diabetic rats. **J. Hypertens.**, v. 6, p. 677-683, 1988.

HAYASHI, M.; SENBA, S.; SIRRO, I.; KITAJIMA, W.; SARUTA, T. Changes in blood pressure, urinary kallikrein, and urinary prostaglandin E₂ in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 322, p. 290-294, 1983.

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

HEBDEN, R. A.; BENNETT, T.; GARDINER, S. M.: Blood pressure recovery following haemorrhage in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Circ. Shock** , v. 26, p. 321-330, 1988.

HODGSON, W. C.; KING, R. G.; BOURA, A. L. Augmented potentiation of renal vasoconstrictor responses by TXA₂ receptor stimulation in the alloxan diabetic rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 42, p. 423-27, 1990.

HODGSON, W. C.; SIKORSKI, B. W.; KING, R. G. Cardiovascular sensitivity changes to eicosanoids in rats with experimentally induced diabetes mellitus. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 19, p. 9-15, 1992.

HOLEMANS, K.; AERTS, L. ; VAN ASSCHE, E. A. Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 34, p. 81-85, 1991.

HOLEMANS, K.; AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A. Absence of pregnancy induced alterations in tissue insulin sensitivity in the offspring of diabetic rats. **J. Endocrinol.**, v. 131, p. 387-393, 1991.

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

HOLEMANS, K.; AERTS, L.; ASSCHE, F.A.V. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 10, p. 392-399, 2003.

HOROWITZ, M.; MENICE, C. B.; LAPORT, R.; MEGAN, K. G. Mechanism of smooth muscle contraction. **Physiol. Reviews**, v. 76, p. 429-438, 2002.

HUXLEY, A. F.; NIEDERGERKE, R. Structural changes in muscle during contraction. **Nature**, v. 173, p. 971-973, 1954.

HUXLEY, R. R.; SHIELL, A. W.; LAW, C. M. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. **J. Hypertens.**, v. 18, p. 815-831, 2000.

IGNARRO, L. J.; MURAD, F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Adv. Pharmacol.**, v. 34, p. 1-516, Academic Press, 1995.

IKEBE, M; BROZOVICH, F. V. Protein kinase C increases forces and slows relaxation in smooth muscle: Evidence for regulation of the myosinlight chain phosphatase. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 225, p. 370-376, 1996.

IKEBE, M. Contractile Mechanisms: Biochemistry of smooth muscle contraction. **Science**, v. 274, p. 367-368, 1996.

IKENAGA, H; BAST, J. P.; FALLET, R. W; CARMINES, P. K. Exaggerated impact of ATP-sensitive K⁽⁺⁾ channels on afferent arteriolar diameter in diabetes mellitus. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, p. 1199-207, 2000.

INOUCHI, T.; LI, P.; UMENDA, F.; YU, H. Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C - dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, p. 1939-1945, 2000.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 55-62, 2001.

IRIGOYEN, M. C.; LACCHINI, S.; ANGELIS, K.; MICHELINI, L. C. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 1, p. 20-45, 2003.

JACKSON, C. V.; CARRIER, G. O. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 5, p. 260-265, 1983.

JACKSON, W. F. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 265, p. H1797-H1803, 1993.

JACKSON, W. F.; KONIG, A.; DAMBACHER, T.; BUSSE, R. Prostacyclin-induced vasodilation in the rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 264, p. H238-H243, 1993.

JACKSON, W. F.; HUEBNER, J. M.; RUSCH, N. J. Enzymatic isolation and characterization of single vascular smooth muscle cells from cremasteric arterioles. **Microcirculation**, v. 4, p. 35-50, 1997.

JACKSON, W. F. Potassium channels and regulation of the microcirculation. **Microcirculation**, v. 5, p. 85-90, 1998.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-178, 2000.

JAMES, G. M.; HODGSON, W. C. Potentiation by endothelin-1 of 5 hydroxytryptamine responses in aortae from streptozotocin-diabetic rats: a role for thromboxane A2. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1236-40, 1995.

JARRETT, J. R.; KEEN, H. Hyperglycemia and diabetes mellitus. **Lancet**, v. 2, p. 1009-1012, 1976.

JENKINSON, D. H. Potassium channels--multiplicity and challenges. **Br J Pharmacol.**, v. 147, p. 63-71, 2006.

JOBIDON, C.; NADBAU, A.; TANCREDE, G.; ROUSSBAU-MIGNARON, S. Diminished hypotensive response to isoproterenol in streptozotocin diabetic rats. **Gen. Pharmacol.**, v. 20, p. 39-46, 1989.

JOHNSTONE, M. T.; CREAGER, S. J.; SCALES, K. M.; CUSCO, J. A.; LEE, B. K.; CREAGER, M. A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 88, p. 2510-16, 1993.

JORGENSEN, R. G.; RUSSO, L.; MATTIOLI, L.; MOORE, W. V. Early detection of vascular dysfunction in type I diabetes. **Diabetes**, v. 37, p. 292-296, 1988.

JOVANOVIC, L. What is so bad about a big baby? **Diab Care**, v. 24, p. 1317-1318, 2001.

JOVANOVIĆ, L.; PETTIT, D. J. Gestational diabetes mellitus. **JAMA**, v. 286, p. 2516 - 2518, 2001.

KHAN, N. A. Role of lipids and fatty acids in macrosomic offspring of diabetic pregnancy. **Cell Biochem Biophys.**, v. 48, p. 79-88, 2007.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. **JAMA**, v. 241, p. 2035-8, 1979.

KARAKI, H.; SATO, K.; OZAKI, H.; MURAKAMI, K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 156, p. 259-266, 1988.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; MANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p. 157-230, 1997.

KATAYAMA, S.; LEE, J. B. Hypertension in experimental diabetes mellitus: renin-prostaglandin interaction. **Hypertension**, v. 7, p. 554-561, 1985.

KATZ, B. Les constantes électriques de la membrane du muscle. **Arch. Sci. Physiol.**, v. 2, p. 285-299, 1949.

KARLSSON, K.; KJELLMER, I. The outcome of diabetic pregnancies in relation to the mother's blood sugar level. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 112, p. 213-220, 1972.

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

KERWIN, J. F. JR.; LANCASTER, J. R. JR.; FELDMAN, P. L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 4343-4362, 1995.

KEVIN, S. T.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can. J. Pharmacol.**, v. 83, p. 215-242, 2005.

KIRSCH, G. E.; DREWE, J. A. Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. **J Gen Physiol.**, v. 102, p. 797-816, 1993.

KITAZAWA, T.; MASUO, M.; SOMLYO, A. P. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. **Proc. Nat Acad. Sci**, v. 88, p. 9307-10, 1991.

KNOT, H. J.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. California: Academic Press, 1999. cap. 16, p 203-219.

KNOT, H. J.; ZIMMERMANN, P. A.; NELSON, M. T. Extracellular $K_{(1)}$ -induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier $K_{(1)}$ channels. **J. Physiol. (Lond)**, v. 492, p. 419-430, 1996.

KNUFMAN, N. M. J.; LAARSE, A. V. D; VLIGEGEN, H. W; BRINKMAN, C. J. J. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol treated rats. **Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 57, p. 15-32, 1987.

KOHLEE, L.; BOILLAT, N.; LUTHI, P.; ATKINSON, J.; PRRERS-HWELI, L. Influence of streptozotocin-induced diabetes on blood pressure and on renin formation and release. **Naunyn Schm. Arch. Pharmacol.**, v. 313, p. 257-261, 1980.

KOLTAI, M. Z.; HADHAZY, P.; POSA, I.; KOCSIS, E.; WINKLER, G.; ROSEN, P.; POGATSA, G. Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. **Cardiovasc. Res.**, v. 34, p. 157-163, 1997.

KONE, B. C.; KUNCEWCZ, T.; ZHANG, W.; XHI-YUAN, Y. U. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the time, the right place, and the right amount of nitric oxide. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, p. 178-190, 2003.

KOULMANDA, M.; QIPO, A.; AUCHINCLOSS, H. JR.; SMITH, R. N. Effects of streptozotocin on autoimmune diabetes in NOD mice. **Clin Exp Immunol.**, v. 134, p. 210-6, 2003.

KUHL, C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM: implications for diagnosis and management. **Diabetes**, v. 40, p. 18-24, 1991.

KUSAKA, M.; KISHI, K.; SOIAER, H. Does so-called streptozocin hypertension exist in rats? **Hypertension**, v. 10, p. 517-521, 1987.

LAAKSO, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, p. 937-942, 1999.

LAHLOU, S.; DUARTE, G. P. Bromocriptine-induced tachycardia in conscious rats: blunted response following isoproterenol pretreatment for 5 days. **Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v. 48, p. 65-174, 1998.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8 cineole, terpenoid oxide present in many plant essential oil, in normotensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, p. 1125-1131, 2002.

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

LANGLEY, S. C.; JACKSON, A. A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. **Clin. Sci.**, v. 86, p. 217-22, 1994.

LANGLEY-EVANS, S. C.; GARDNER, D. S.; WELHAM, S. J. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. **Nutrition**, v. 1, p. 39-47, 1998.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, N. B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. H927-34, 1991.

LAW, C. M.; SHIELL, A. W. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. **J. Hypertens.**, v. 14, p. 935-941, 1996.

LAW, C. M.; SHIELL, A. W.; NEWSOME, C. A.; SYDDALL, H. E.; SHINEBOURNE, E. A.; FAYERS, P. M.; MARTYN, C. N.; DE SWIET, M. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. **Circulation**, v. 24, p. 106-13, 2002.

LEHTO, S.; RONNEMAA, T.; HAFFNER, S. M.; KALLIO, V.; LAAKSO, M. Dislipidemia and hiperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, p. 1354-1359, 1997.

LEPERCQ, J.; TAUPIN, P.; DUBOIS-LAFORGUE, D., DURANTEAU, L., LAHLOU, N. ; BOITARD, C.; LANDAIS, P.; HAUGUEL-DE, S M.; TIMSIT, J. Heterogeneity of fetal growth in type 1 diabetic pregnancy. **Diab Metab.**, v. 27, p. 339-344, 2001.

LI, X-AN.; EVERSON, W. V.; SMART, E. J. Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 15, p. 92-96, 2005.

LINCOLN, T. M.; CORNWELL, T. L.; TAYLOR, A. E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{+2} by cAMP in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. C399-C407, 1990.

LLOYD-MOSTYN, R. H; WATKINS, P. J. Defective innervation of heart in diabetic autonomic neuropathy. **Br. Med. J.**, v. 3, p. 15-17, 1975.

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 Res.**, v. 4, p. 107-18, 2003.

LURIE, K. G.; CHIN, J. H.; HOFFMAN, B. B. Decreased membrane fluidity and β adrenergic responsiveness in the atherosclerotic quail. **Am. J. Physiol.**, v. 249, p. H380-H385, 1985.

MAEDA, C. V.; FERNANDES, T. G.; TIMM, H. B.; IRIGOYEN, M. C. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. **Hypertension**, v. 26 , p. 1100-1104, 1995.

MAGATON, A.; GIL, F. Z.; CASARINI, D. E.; CAVANAL, M. F. GOMES, G. N. Maternal diabetes mellitus – early consequences for the offspring. **Pediatr. Nephrol.**, v. 22, p. 37-43, 2007.

MAGYAR, J.; RUSZNAK, Z.; SZENTESI, P.; SZUCS, G.; KOVACZ, L. Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 24, p. 844–853, 1992.

MAJITHIYA, J. B.; BALARAMAN, R. Time-dependente changes in Antioxidant Enzymes and Vascular Reactivity of Aorta in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats treated with Curcumin. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 46, p. 697-705, 2005.

- MANDERSON, J. G.; MULLAN, B.; PATTERSON, C. C.; HADDEN, D. R.; TRAUB, A. I.; MCCANCE, D. R. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. **Diabetologia**, v. 45, p. 991–996, 2002.
- MARINETTI, G. V. **Disorders of lipid metabolism**. New York: Plenum Press, 1990. p. 226.
- MARLETTA, M. A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 1, p. 249-257, 1988.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12231- 12234, 1993.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p. 8706-8711, 1988.
- MARTENS, J. R.; GELBAND, C. H. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K1 channels in genetic and nongenetic hypertension. **Circ. Res.**, v. 79, p. 295-301, 1996.
- MARTIN, A. O.; SIMPSON, J. L.; OBER, C.; FREINKEL, N. Frequency of diabetes mellitus in mothers of probands with gestational diabetes: possible maternal influence on the predisposition to gestational diabetes. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 151, p. 471-475, 1985.
- MAYHAN, W. G. Effect of diabetes mellitus on response of the basilar artery to activation of ATP-sensitive potassium channels. **Brain Res.**, v. 636, p. 35-39, 1994.
- MAYHAN, W. G.; FARACI, F. M. Responses of cerebral arterioles in diabetic rats to activation of ATP-sensitive potassium channels. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 993, p. H152-H157, 1993.
- MCCANCE, D. R.; HANSON, R. L.; PETTITT, D. J.; BENNETT, P. H.; HADDEN, D. R.; KNOWLER, W. C. Diagnosing diabetes mellitus- do we need new criteria? **Diabetologia**, v. 40, p. 247-55, 1997.
- MCDANIEL, N. L.; REMBOLD, C. M.; RICHARD, H. M.; MURPHY, R. A. Cyclic AMP relaxes swine arterial smooth muscle predominantly by decreasing cell Ca^{2+} concentration. **J. Physiol.**, v. 439, p. 147-160, 1991.
- MCLEAN, M.; CHIPPS, D.; WAH CHEUNG, N. Mother to child transmission of diabetes mellitus: does gestational diabetes program Type 2 diabetes in the next generation? **Diabet. Med.**, v. 23, p. 1213-1215, 2006.
- MELDRUM, E.; PARKER, P. J.; CAROZZI, A. PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1092, p. 49-71, 1991.
- MENEZES, H. S.; BARRA, M; BELLO, A. R.; MARTINS, C. B., ZIELINSKY, P. Fetal myocardial hypertrophy in experimental model of gestacional diabetes. **Cardiol. Young.**, v. 6, p. 609-13, 2001.

MIHM, M. J.; SEIFERT, J. L.; COYLE, C. M.; BAUER, J. A. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. **Life sci.**, v. 69, p. 527-42, 2001.

MINATOBUCHI, S.; ARAI, M.; UNO, Y.; KARIYA, T.; NISHIDA, Y.; HASHIMOTO, K.; KAWASAKI, M.; TAKEMURA, G.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. A novel anti diabetic drug, miglitol, markedly reduces myocardial infarct size in rabbits. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, p. 1667-72, 1999.

MISURSKI, D. A.; GOPALAKRISHNAN, V. Role of calcium-activated potassium channels in impaired acetylcholine vasodilatory responses in diabetic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 39, p. 685-94, 2002.

MOKLER, C. M.; ABDEL-AZIZ, M. T.; HERIC, E. Effects of hypercholesterolemia on beta adrenoceptors in the rabbit heart. **Drug Nutr. Interact.**, v. 3, p. 165-172, 1985.

MOORE, V. M.; COCKINGTON, R. A.; RYAN, P.; ROBINSON, J. S. The relationship between birth weight and blood pressure amplifies from childhood to adulthood. **J. Hypertens.**, v. 17, p. 883-8, 1999.

MOORHOUSE, J. A.; CARTER, S. A.; DOUPE, J. Vascular responses in diabetic peripheral neuropathy. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 883-88, 1966.

NASCIMENTO, C. A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J. C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: LUZ, P. L.; LAURINDO, F. M. R.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo: Ed. Atheneu; 2003. p. 116.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; SATANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am. J. Cell. Physiol.**, v. 259, p. C3-C18, 1990.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 799-822, 1995.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X.L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M.A.; BEEBE, D.; OATES, P.J.; HAMMES, H.P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-790, 2000.

NISHIMURA, J. Topics on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: involvement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 102, p. 27-31, 2006.

NOBE, K.; SAKAI, Y.; MARUYAMA, Y.; MOOSE, K. Hyper-reactivity of diacylglycerol kinase is involved in the dysfunction of aortic smooth muscle contractility in streptozotocin-induced diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 441-451, 2002.

NOMA, A. ATP-regulated K1 channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, p.147-148, 1983.

OZTURK, Y.; ALTAN, V. M.; YILDIZOGLU-ARI, N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, p. 69-112, 1996.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 12 , p. 89-92, 2005.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-6, 1987.

PAPAPORT, R. M.; WALDMAN, S. A.; SCHWARTZ, K.; WINQUIST, R. J.; MURAD, F. Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 219-229, 1985.

PASTON, L.; TAYLOR, P. D. Endothelium-mediated vascular function in insulin-dependent diabetes mellitus. **Circ Res**, v. 88, p. 245–255, 1995.

PEDERSEN, J. **The pregnant diabetic and her newborn: problems and management.** Williams & Wilkins, Baltimore, 1977.

PETTITT, D. J.; ALECK, K. A.; BAIRD, H. R.; CARRAHER, M. J.; BENNETT, P. H.; KNOWLER, W. C. Congenital susceptibility to NIDDM. Role of the intrauterine environment. **Diabetes**, v. 37, p. 622-628, 1988.

PFAFFMAN, M. A. The effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the cardiovascular system of the rat. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 28: , p. 27-41, 1980.

PIEPER, G. M.; LANGENSTROER, P.; SIEBENEICH, W.. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. **Cardiovasc. Res.**, v. 31, p.145-156, 1997.

PIEPER, G. M.; PELTIER, B. A. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25, p. 397-403, 1995.

PIERCE, G. N; RUSSELL, J. C. Regulation of intracellular Ca^{2+} in the heart during diabetes. **Cardiovasc Res.**, v. 34, p. 41-7, 1997.

POLONSKY, K. S.; STURIS, J.; BELL, G. I. Non-insulin-dependent diabetes mellitus. A genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 777-783, 1996.

PROCHAZKA, L.; LILLIOJA, S.; TAIT, J. F; KNOWLER, W. C.; MOTT, D. M.; SPRAUL, M. ; BENNETT, P. H. ; BOGARDUS, C. Linkage of chromosomal markers on 4q with a putative gene determining maximal insulin action in Pima indians. **Diabetes**, p. 514-519, 1993.

QUAYLE, J. M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1165–1232, 1997.

RAHMAN, S.; RAHMAN, T.; ISMAIL, A. Al-S.; RASHID, A. R. A. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 9, p. 767-80, 2006.

RAMOS, O. L. Diabetes mellitus and hypertension: state of the art lecture. **Hypertension**, v. 11, p.114-118, 1988. Suplemento.

REBOLLEDO, A.; AUALA-PAREDES, F.; MILESI, V.; GRASSI, A. O.; RINALDI, G. J. Short-term streptozotocin-induced diabetes induces blood pressure decrease associated with reduced aortic $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and selective depression of the sustained noradrenergic contraction. **Diabetes Metab.**, v. 27, p. 40-48, 2001.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet Med.**, v. 22, p. 359-70, 2005.

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

REMBOLD, C. M. Regulation contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, p. 129-37, 1992.

REMACLE, C.; DUMORTIER, O.; BOL, V.; GOOSSE, K.; ROMANUS, P.; N. THEYS, N.; BOUCKENOOGHE T.; REUSENS, B. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 9, p. 196 - 209, 2007.

REN, Y.; XU, X.; WANG, X. Altered mRNA Expression of ATP-Sensitive and Inward Rectifier Potassium Channel Subunits in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Heart and Aorta. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 93, p. 478-483, 2003.

Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 20, p. 1183-1197, 1997.

RINALD, G. J.; CINGOLANI, H. E. Effect of diabetes on fast response to norepinephrine in rat aorta. **Diabetes**, v. 41, p. 30-34, 1992.

RINALD, G. J.; GRAND, C.; CINGOLANI, H. B. Characteristics of the fast and slow components of the response to noradrenaline in rat aorta. **Can. J. Cardiol.**, v. 7, p. 316-322, 1991.

RINALDI, G. J. Blood pressure fall and increased relaxation of aortic smooth muscle in diabetic rats. **Diabetes Metab.**, v. 31, p. 487-95, 2005.

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

RODGERS, R. L. Depressor effect of diabetes in the spontaneously hypertensive rat: associated changes in heart performance. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 64, p. 1177-1184, 1986.

RODRIGUES, B.; GOYAL, R. K.; MCNEILL, J. H. Effects of hydralazine on streptozotocin-induced diabetic rats: prevention of hyperlipidemia and improvement of cardiac function. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 237, p. 292-299, 1986.

ROSSO, P.; KAVA, R. Effects of food restriction on cardiac output and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. **J Nutr**, v. 110, p. 2350- 2354, 1980.

ROTHBER, K. G.; HEUSER, J. E.; DONZELL, W. C.; YING, Y. S.; GLENNEY, J. R., ANDERSON, R. G.; Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell**, v. 68, p. 673-682, 1992.

RUBATTU, S.; VOLPE, M.; ENEA, I.; RUSSO, R.; ROMANO, M.; TRIMARCO, B. Influence of hypercholesterolemia on adrenal steroid metabolism and electrolyte balance in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**, v. 133, p. 2015-2021, 1993.

SADOSHIMA, J.; AKAIKE, N.; KANAIDE, H.; NAKAMURA, M. Cyclic AMP modulates Ca^{2+} -activated K^{+} channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. 754-759, 1988.

SAITO, Y.; MCKAY, M.; ERASLAN, A.; HESTER, R. L. Functional hyperemia in striated muscle is reduced following blockade of ATP-sensitive potassium channels. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 270, p. H1649–H1654, 1996.

SANTOS JUNIOR, E. R. **O efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina em ratas wistar na fase pré-gestacional e gestacional e suas consequências no conceito**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SANZ, E.; FERNÁNDEZ, N.; MONGE, L.; CLIMENT, B.; DIÉGUEZ, G.; GARCÍA-VILLALÓN, A. L. Role of $\text{K}^{(+)}$ channels in the coronary and renal vascular reactivity to vasopressin in diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 471, p. 35-40, 2003.

SAWICKI, P. T.; KIWITT, S.; BENDER, R.; BERGER M. The value of QT interval dispersion for identification of total mortality risk in non-insulin-dependent diabetes Mellitus. **J. Intern. Med.**, v. 243, p. 49-56, 1998.

SBAA, E.; FRÉRART, F.; FERON, O. The double regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolae and caveolin: a paradox solved through the study of angiogenesis. **Cardiovasc. Med.**, v. 15, p. 157-162, 2005.

SCARBOUROUGH, N. L.; CARRIER, G. O. Nifedipine and alpha adrenoceptores in rat aorta. II. Role of extracellular calcium in enhanced alpha-2-adrenoceptor-mediated contraction in diabetes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 23, p. 603-609, 1984.

SHAAT, N.; GROOP, L. Genetics of gestational Diabetes Mellitus. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 569-83, 2007.

SCHAAN, B. D.; MAEDA, C. Y.; TIMM, H. B; MEDEIROS, S.; MORAES, R. S.; FERLIN, E.; FERNANDES, T. G.; RIBEIRO, J. P., SCHMID, H.; IRIGOYEN, M. C. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin induced diabetic rats treated with insulin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 1081-1086, 1997.

SCHONEBERG, T. SCHULTZ, G.; GUDERMANN, T. Structural basis of G protein-coupled receptor function. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 151, p. 181-193 (1999).

SCHWENCKE, C.; BRAUN-DULLEUS, R.; WUNDERLICH, C.; STRASSER, R. H. Caveolae and caveolin in transmembrana signaling: implications for humane disease. **Cardiovasc. Res.**, v. 70, p. 42-49, 2006.

SEINO, S. Physiology and pathophysiology of K(ATP) channels in the pancreas and cardiovascular system: a review. **J. Diabetes Complications**, v. 17, p. 2-5, 2003. Suplemento.

SHAAN, B. C.; DALL'AGO, P.; MAEDA, C. Y.; FERLIN, E.; FERNANDES, T. G.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M. C. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Bras. J. Med. Biol Res.**, v. 37, p. 1895-1902, 2004.

SHIEH, C. C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol Rev.**, v. 52, p. 557-94. 2000

SHIMONI, Y.; EWART, H. S. ; SEVERSON, D. Insulin stimulation of rat ventricular K⁺ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. **J. Physiol.**, v. 514, p. 735-745, 1999.

SILVERMAN, B. L.; RIZZO, T. ; GREEN, O. C.; CHO, N. H. ; VINTER, R. J.; OGATA, E. S.; RICHARDS, B. E.; METZGER, B.E. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. **Diabetes**, v. 40, p. 121-125, 1991. Suplemento.

SIM, M-K; XU, X-G; WONG, Y-C; SIM, S-Z; LEE, K-O. Des-aspartate-angiotensin I exerts hypoglycemic action via GLUT4 translocation in type 2 diabetic KKAy mice and GK rats. **Endocrinology**, v. 148, p. 5925-32, 2007.

SIMMONS, R. A. Developmental origins of diabetes: the role of epigenetic mechanisms. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.**, v. 14, p.13-6, 2007.

SIMPSON, J. L.; ELIAS, S.; MARTIN, A. O.; PALMER, M. S.; OGATA, E. S.; RADVANY, R. A. Diabetes in pregnancy, Northwestern University series (1977-1981). I. Prospective study of anomalies in offspring of mothers with diabetes mellitus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 146, p. 263-270, 1983.

SMITH, M. P.; HUMPHREY, S. J.; JACKSON, W. F. Selective in vivo antagonism of pinacidil-induced hypotension by the guanidine U37883A in anesthetized rats. **Pharmacology**, v. 49, p. 363 - 375, 1994.

SOBREVIA, L.; MANN, G. E. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. **Exp Physiol.**, v. 82, p. 423-52, 1997.

SOBNGWI, E.; BOUDOU, P.; MAUVAIS-JARVIS, F.; LEBLANC, H.; VELHO, G.; VEXIAU, P. Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. **Lancet**, v. 361, p. 1861-1865, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso brasileiro sobre diabetes**. Rio de Janeiro, 2002. 73 p.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO A. P. Electomechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 159, p. 129-145, 1968.

STRIFFLER, J. S.; NADLER, J. L. Lisofylline, anovel anti-inflammatory agent, enhances glucose-stimulated insulin secretion in vivo and in vitro: studies in prediabetic and normal rats. **Metabolism**, v. 53, p. 290-6, 2004.

TAKEDA, Y.; MIYAMORI, I.; YONEDA, T.; TAKEDA, R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.**, v. 48, p. 2553-2556, 1991.

TATEISHI, J; FABER, J. E. ATP-sensitive K₁ channels mediate alpha 2D-adrenergic receptor contraction of arteriolar smooth muscle and reversal of contraction by hypoxia. **Circ. Res.**, v. 76, p. 53-63, 1995.

TAYLOR, O. D; MCCARTHU, A. L; THOMAS, C. R.; POSTON, L. Endothelium - Dependent Relaxation and Noradrenaline Sensitivity in Mesenteric Arteries of Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 393-399, 1992.

TEIXEIRA, L.; MACHADO, A. C. Diabetes Mellitus – classificação e Diagnóstico. *In*: VILAR, L.; TEIXEIRA, E.; MOURA, E.; LEAL, E.; MACHADO, A.C.; TEIXEIRA, L.; CAMPOS, R. **Endocrinologia Clínica**, 2ª edição. Editora MEDSI, Rio de Janeiro, 2001, p. 551-523.

TESCH, G. H.; ALLEN T. J. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Nephrol.**, v. 12, p. 261- 266, 2007.

THOMAS, G. D.; HANSEN, J.; VICTOR, R. G. ATP-sensitive potassium channels mediate contraction-induced attenuation of sympathetic vasoconstriction in rat skeletal muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2602-2609, 1997.

THRASHER, T. N. Baroreceptors and the long-term control of blood pressure. **Exp. Physiol.**, v. 89, p. 331-335, 2004.

THULESEN, J.; POULSEN, S. S.; NEXO, E.; RAABERG, L. Epidermal growth factor and lung development in the offspring of the diabetic rat. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 29, p. 103-112, 2000.

TOBOREK, M.; KAISER, S. Endothelial cell functions: Relationship to aterogenesis. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 94, p. 295-314, 1999.

TOMLINSON, K. C.; GARDINER, S. M.; BENNETF, T. Blood pressure in streptozotocin-treated Brattleboro and Long Evans rats. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. R852-R859, 1990.

TOMLINSON, K. C.; GARDINER, S. M.; HEBDEN, R. A.; BENNETT, T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, p. 103-150, 1992.

- TOOKE, J. E. Microvascular function in human diabetes. **Diabetes**, v. 44, p. 721–726, 1995.
- TRAVERS, J. P.; PRATTEN, M.K.; BECK, F. Effects of low insulin levels on rat embryonic growth and development. **Diabetes**, v. 38, p. 773–778, 1989.
- UGOCHUKWU, N. H.; BAGAYOKO, N. D.; ANTWI, M. E. The effects of dietary caloric restriction on antioxidant status and lipid peroxidation in mild and severe streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin Chim Acta.**, v. 348, p. 121-9, 2004.
- ULLRICH, A.; GRAY, A.; TAM, A. W.; YANG-FENG, T.; TSUBOKAWA, M.; COLLINS, C.; HENZEL, W.; LE BON, T.; KATHURIA, S.; CHEN, E. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. **EMBO J.**, v. 5, p. 2503- 2512, 1986.
- VANHOUTTE, P. M. Endothelial control of vasomotor function, from health to coronary disease. **Circ. J.**, v. 67, p. 572-575, 2003.
- VISSER, J.; KLATTER, F.; VIS, L.; GROEN, H.; STRUBBE, J.; ROZING, J. Long-term prophylactic insulin treatment can prevent spontaneous diabetes and thyroiditis development in the diabetes-prone bio-breeding rat, while short-term treatment is ineffective. **Eur J Endocrinol.**, v. 149, p. 223-9, 2003.
- WALD, N. J.; LAW, M. R. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. **Atherosclerosis**, v. 118, p. S1-S5, 1995. Suplemento.
- WALSTON, J.; SILVER, K.; BOGARDUS, C.; KNOWLER, W. C.; CELI, F. S.; AUSTIN, S.; MANNING, B.; STROSBURG, A. D.; STERN, M. P.; RABEN, N. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta3-adrenergic receptor gene. **N. Engl. J Med.**, v. 333, p. 343-347, 1995.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advan. Physiol. Educ.**, v. 4, p. 201-206, 2003.
- WELLMAN, G. C.; NELSON, M. T. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca^{2+} sensitive ions channels. **Cell Calcium**, v. 34, p. 211-229, 2003.
- WHEATCROFT, S. B.; WILLIAMS, I. H.; SHAH, A. M.; KEARNEY, M. T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. **Diabet. Med.**, v. 20, p. 255-268, 2003.
- WICHI, R. B.; SOUZA, S. B.; CASARINI, D. E; MORRIS, M.; BARRETO-CHAVES, M.L.; IRIGOYEN, M. C. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. **Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.**, v. 288, p. 1129-1133, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes Mellitus and its complications**. Report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes Mellitus, 1999.

WHINCUP, P. H.; COOK, D. G.; PAPACOSTA, O. Do maternal and intrauterine factors influence blood pressure in childhood? **Arch. Dis. Child.**, v. 67, p. 1423-9, 1992.

YAMAMOTO, J. Blood pressure and metabolic effects of streptozotocin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 10, p. 1065-1083, 1988.

YAMAMOTO, J.; NAKAI, M. Coronary hemodynamics in diabetic spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 12, p. 325-342, 1990.

YE, C. L.; SHEN, B.; REN, X.; LUO, R-J; DING, C. U., YAN, F-M, JIANG, J-U. An increase in opening of B_{KCa} channels in smooth muscle cells in streptozotocin-induced diabetic mice. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 25, p. 744-750, 2004.

YU, J.; BERGAYA S.; MURATA, T.; ALP, I. F.; BAUER, M. P.; LIN, M. I.; DRAB, M.; KURZCHALIA, T. V.; STAN, R. V., SESSA W. C. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. **JCI**, v. 116, p. 1284-1291, 2006.

ZANETTI, M.; SATO, J.; KATUSIC, Z. S. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. **Am. J. Physiol**, v. 280, p. 2516-2523, 2001.

ZHANG, J.; KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M.; HUANG, P.; HILL, C. E. Protective effect of endothelial nitric oxide synthase against induction of chemically-induced diabetes in mice. **Nitric Oxide**, v. 17, p. 69-74, 2007.

ZIMMERMANN, P. A.; KNOT, H. J; STEVENSON, A. S.; NELSON, M. T. Increased myogenic tone and diminished responsiveness to ATP-sensitive K^+ channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. **Circ. Res.**, v. 81, p. 996-1004, 1997.