

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

Dissertação de Mestrado

**Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno:
Contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua
repercussão em diferentes idades**

DIEGO BARBOSA DE QUEIROZ

Orientador: Prof.Dr. Fabiano Elias Xavier

Recife, 2010.

DIEGO BARBOSA DE QUEIROZ

Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno: Contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua repercussão em diferentes idades.

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

ORIENTADOR

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

RECIFE

2010

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Queiroz, Diego Barbosa de

Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno: contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua repercussão em diferentes idades/ Diego Barbosa de Queiroz– Recife: O Autor, 2013.

87 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Fabiano Elias Xavier

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Diabetes na gravidez 2. Metabolismo 3. Fisiologia I. Xavier, Fabiano Elias (orientador) II. Título**

618.3646

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 323

“Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno:
Contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua
repercussão em diferentes idades”

Diego Barbosa de Queiroz

Banca Examinadora

PROF.DR. FABIANO ELIAS XAVIER – PRESIDENTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROF^a.DR^a. GLÓRIA ISOLINA BOENTE PINTO DUARTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROF^a.Dr^a. ANA DURCE OLIVEIRA DA PAIXÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROF^a. DR^a. LUIZA ANTAS RABELO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil,
no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”**

(Albert Einstein)

**Dedico este trabalho, especialmente à minha Mãe, meu Pai e ao meu
irmão, Anderson de Queiroz.**

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre ao meu lado, me dando força para conseguir vencer todos os desafios da vida.

À minha família, por me ensinar valores humanos e apoiar incondicionalmente minhas decisões na vida profissional.

Ao professor Fabiano Elias Xavier, pela sua orientação científica neste estudo, e acima de tudo pela sua amizade conquistada, sendo para mim, uma honra e motivo de admiração poder trabalhar ao seu lado.

A professora Glória Isolina Duarte, por toda sua sabedoria e conselhos imprescindíveis, a minha formação de pesquisador.

A professora Luiza Antas Rabêlo e seu aluno Lucas da Fonseca pela colaboração e auxílio científicos neste trabalho.

Em especial a Odair Alves por sua ajuda e companheirismo e à Fernanda Elizabete, por quem sou imensamente grato, pela sua ajuda no desenvolvimento dos experimentos e das discussões até tarde da noite e fins de semana no laboratório.

A todos os meus amigos que fazem o LFFCV e o LRV, Carolina, Hicla, Juliana Dantas, Juliana Rocha, Luciana Veloso, Marcelo, Manuella, Thaíse, Thayane Ferreira, Alisson, professora Cristina e professor Alex.

Ao técnico de laboratório José Antônio, ao secretário de pós-graduação Djalma Silva, e aos funcionários responsáveis pela limpeza Thiago e Marilene.

A todos os professores e amigos da pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O conceito da “programação fetal” sugere que um indivíduo pode ser “programado” durante as fases intra-uterina e perinatal para desenvolver doenças na vida adulta. A literatura mostra que o diabetes materno produz importantes alterações metabólicas na prole adulta, predispondo-os ao surgimento de doenças cardiovasculares. Este estudo analisou se o Diabetes mellitus durante a gravidez produz alterações nos parâmetros cardiovasculares em preparações de artéria aorta na prole adulta em diferentes idades e os possíveis mecanismos envolvidos nestas alterações. O diabetes materno foi induzido por estreptozotocina em ratos Wistar. Alterações na homeostasia da glicose, como intolerância a glicose e resistência à insulina foram observados nos ratos adultos com 3, 6 e 12 meses de idade provenientes de mães diabéticas (STZ), como também uma redução do peso corporal. Através da medida direta da PA, a PAM dos ratos com 6 e 12 meses de idade provenientes de ratas diabéticas apresentaram elevadas quando comparado aos seus respectivos controles. Ao analisar a reatividade vascular na artéria aorta dos ratos STZ12M, estes apresentaram modificações significativas no relaxamento à acetilcolina e na contração induzida pela fenilefrina, demonstrando um quadro de disfunção endotelial. Para avaliar o envolvimento dos metabólitos derivados do ácido araquidônico neste quadro de disfunção, foram utilizados inibidores da COX-1 e 2 (indometacina) ou da COX-2 (NS-398), onde ambos aumentaram o relaxamento e reduziram a contratilidade, significativamente, nas artérias dos ratos STZ12M. A participação do TXA₂ e de outros derivados vasoconstritores da COX-2, foi verificada com o antagonista do receptor TP (SQ29548), o inibidor da síntese do TXA₂ (furegrelato), o antagonista dos receptores EP₁, EP₂ e EP₃ (AH 8809) e do receptor FP (AL8810). Em aorta dos ratos STZ12M, os valores percentuais de relaxamento e contração compatível com a observada na presença dos inibidores de COX somente foi alcançada quando pré-incubadas na presença do SQ29548 + AH6809, A presença do AL8810 não induziu qualquer efeito adicional nestes parâmetros. Esses resultados sugerem que o Diabetes mellitus durante a fase intrauterina e perinatal causa modificações metabólicas e cardiovasculares de maneira tempo-dependente em ratos adultos. Além disso, também demonstram que a redução da função endotelial está associada com o aumento da participação de prostanóides vasoconstritores derivados da isoforma induzível da COX (COX-2).

Palavras-chave: Diabetes Gestacional, disfunção endotelial e COX-2.

ABSTRACT

The concept of "fetal programming" suggests that an individual can be "programmed" during intrauterine phases and perinatal diseases to develop in adulthood. The literature shows that maternal diabetes has important metabolic changes in adult offspring, predisposing them to the emergence of cardiovascular disease. This study examined whether diabetes mellitus during pregnancy causes changes in cardiovascular parameters in preparations of the aorta artery in adult offspring at different ages and the possible mechanisms involved in these changes. The maternal diabetes was induced by streptozotocin in Wistar rats. Changes in glucose homeostasis, through the direct measurement of BP, MAP of STZ rats at 6 and 12 months old showed elevated when compared to their respective controls. By analyzing the vascular reactivity in rat aorta STZ12M this show significant changes in relaxation to acetylcholine and contractility to phenylephrine, showing endothelial dysfunction. To assess the involvement of arachidonic acid metabolites derived in the dysfunction of these arteries were used COX-1 and 2 (indomethacin) or COX-2 (NS-398), where the relaxation increased and impaired the contraction significantly in the arteries of rats STZ12M. The participation of TXA2 vasoconstrictors and other derivatives of COX-2 was observed with the TP receptor antagonist (SQ29548), the inhibitor of the synthesis of TXA2 (furegrelato), the antagonist EP1, EP2 and EP3 (AH 8809) and FP receptor (AL8810). In aorta of STZ12M, the values of relaxation to acetylcholine and contraction-induced to phenylephrine compatible with that observed in the presence of COX inhibitors was only achieved when preincubated in the presence of AH6809 + SQ29548, the presence of AL8810 did not produce any additional effect on the both reactivity analysis. These results suggest that for diabetes mellitus and the perinatal intrauterine phase cause cardiovascular and metabolic changes of a time-dependent manner in adult rats. It also shows that the reduction of endothelial function is associated with the increased involvement of vasoconstrictors prostanoids derived from the inducible isoform of COX (COX-2).

Keywords: Maternal diabetes, endothelial dysfunction and COX-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos intracelulares implicados na contração muscular. AA: ácido araquidônico, CaM: calmodulina, DAG: diacilglicerol, IP3: inositol 1,4,5-trifosfato, MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos, MLC20: cadeia leve da miosina, MLCK: quinase da cadeia leve da miosina, PIP2: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, PLA2: fosfolipase A2, PLC: fosfolipase C, PKC: proteína quinase C, RS: retículo sarcoplasmático. (Adaptado de Abdel-Latif, 2001).

Figura 2. Mecanismos de relaxamento induzido pelo NO. GCs: guanilato ciclase solúvel, PKG: proteína quinase dependente de GMPc, RS: retículo sarcoplasmático, SERCA: Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático, MLCK: quinase da cadeia leve da miosina, IP3: inositol 1,4,5-trifosfato, CML: célula muscular lisa.

Figura 3. Síntese e mecanismos de ação de prostanóides. AA: ácido araquidônico, AC: adenilato ciclase, AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina, DP: receptor da PGD₂, EP: receptor de PGE, FP: receptor de PGF₂α, IP: receptor de PGI₂, TP: receptor de TxA₂, PLA2: fosfolipase A2, PLC: fosfolipase C, TPG: transportador de prostaglandinas.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.2. O DM E AS COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES.	12
1.3. O SISTEMA VASCULAR	14
1.3.1. <i>Contração e relaxamento do músculo liso vascular</i>	14
1.3.2. <i>O endotélio vascular</i>	17
1.3.2.1. <i>Fatores vasodilatadores derivados do endotélio</i>	18
1.3.2.2. <i>Fatores vasoconstritores derivados do endotélio</i>	21
1.3.2.3. <i>Prostaglandinas vasoconstritoras</i>	24
1.4. PAPEL DO ENDOTÉLIO NA FISIOPALOGIA DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES LIGADAS AO DM.	28
1.5. DIABETES GESTACIONAL E AS COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES.....	31
2. Objetivos	37
2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	37
Artigo a ser submetido no periódico <i>Vascular Pharmacology</i>.	38
Introduction	40
Methods	42
<i>Animals</i>	42
<i>Glucose tolerance and Insulin resistance</i>	43
<i>Evaluation of blood pressure</i>	43
<i>Vascular Reactivity Study</i>	43
<i>Protocols</i>	44
<i>Statistical analysis</i>	45
Results	46
<i>Body weight, Glucose tolerance and Insulin resistance</i>	46
<i>Assessment of mean arterial pressure</i>	47
<i>Vascular function in adult offspring rats</i>	47
<i>Role of COX-derived products</i>	48
<i>Pharmacological identification of prostanoids derived from COX-2</i>	48
Discussion	50
References	55

Figure list	61
3.Conclusões	69
4. Referências Bibliográficas	70

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) se tornou um dos maiores problemas de saúde para o século 21, que, para a maioria dos países, tem evoluído em associação com as rápidas mudanças culturais e sociais, aumento da perspectiva de vida, desenvolvimento econômico, mudanças no perfil dietético, sedentarismo e outros padrões de comportamento (WHO, 1994). Estima-se que 5,9% da população mundial tenham diabetes, numa perspectiva de se atingir 7,1% até 2025. No Brasil, dados mais recentes apontam para taxas de 6,9% entre a população com idade entre 30 e 69 anos e chega a atingir cifras de 20 % na população acima dos 70 anos (IDF, 2007).

O DM é uma doença tradicionalmente descrita como uma desordem endócrina, caracterizada por hiperglicemia e intolerância à glicose, devido à deficiência na produção e/ou ação da insulina (HARRIS & ZIMMET, 1997). A classificação do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Associação Americana do Diabetes (ADA) inclui três formas clínicas principais: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2) e o diabetes gestacional.

O DM1 (Diabetes mellitus insulino-dependente), indivíduos com esse tipo de diabetes (na sua maioria crianças e jovens) necessitam de injeções diárias de insulina para controlar os níveis de glicose no sangue. Isso ocorre devido a uma reação auto-imune do organismo, que destrói as células produtoras de insulina (ADA, 2004). As células β pancreáticas produzem muito pouco ou nenhuma quantidade deste hormônio, que é responsável pela entrada da glicose no interior das células (ADA, 2002).

O DM2 afeta 90 a 95% da população diabética e é caracterizada por hiperglicemia crônica freqüentemente acompanhada por dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (STRATTON *et al.*, 2000). As causas para ocorrência deste tipo de diabetes não são precisas. No entanto, alguns fatores como a obesidade e o ganho de peso estão entre os principais fatores

de risco para a DM2 (HENRY *et al.*, 1993). Neste tipo de DM alguns tecidos periféricos como o músculo esquelético e o tecido adiposo são resistentes à insulina, porém nas ilhotas pancreáticas, a secreção de insulina pelas células β é insuficiente para compensar o estado de resistência, podendo gerar mais tardiamente um estado relativo de insuficiência insulínica (DEFRONZO *et al.*, 1992; CUSI *et al.*, 2000).

O DM gestacional caracteriza-se por uma intolerância à glicose de magnitude variável com início ou detecção durante a gravidez. Os indivíduos portadores em sua grande maioria apresentam DM2, onde os altos níveis de glicemia contribuem para aumentar os riscos de complicações associados ao feto como, má formação congênita, aborto, macrosomia e morte perinatal. (MILLS, 1982; CARRAPATO & MARCELINO, 2001).

1.2. O DM e as complicações cardiovasculares.

Uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos e em modelos experimentais de DM está associada com aumento da incidência de doenças cardiovasculares (MORRISH *et al.*, 2001), dentre elas, a doença arterial coronariana, a aterosclerose, o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca e a hipertensão arterial (GARCIA *et al.* 1974, HAFFNER *et al.*, 1990; GAO *et al.*, 2004). No caso específico da hipertensão arterial, sua incidência em pacientes diabéticos chega a ser cerca de duas vezes maior, quando comparado à população não-diabética (PELL *et al.*, 1967; KLEIN *et al.*, 1984; TEUSCHER *et al.*, 1989).

Quando associada ao DM, a hipertensão acelera nestes indivíduos o desenvolvimento de acidentes vasculares cerebrais, de infarto do miocárdio e de nefropatias (ADA, 2003). O risco de morte por complicações cardiovasculares chega a duplicar em pacientes diabéticos que apresentam hipertensão arterial (KANDEL, 1976; RITZ *et al.*, 1985). Fatores como raça, idade, gênero, massa corpórea e tempo de duração do diabetes também contribuem para a elevação da pressão arterial na população diabética.

Embora muito dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão tenham sido elucidados, sua etiologia relacionada ao diabetes ainda permanece pouco conhecida. Nesse contexto, acredita-se que possa estar associado a alguns fatores de risco, como a exposição crônica a níveis elevados de glicose e o desenvolvimento de alterações vasculares (HSUEH & ANDERSON, 1992; SOWERS *et al.*, 2001).

A hiperglicemia no DM causa alterações importantes na parede vascular, acelera a produção de produtos de glicação avançada que se liga a proteínas da parede vascular (BROWNLEE *et al.*, 1988) induzindo a síntese e secreção de citocinas (VLASSARA *et al.*, 1988), estimula a proliferação de células do músculo liso vascular, deposição excessiva de matriz extracelular, hipertrofia e remodelamento da parede arterial. Isto pode acarretar aumento da contração vascular e agravamento do processo aterosclerótico (MAAREK *et al.*, 1987; CUSI *et al.*, 2000).

Também tem sido amplamente demonstrado que a hiperglicemia aguda ou crônica é capaz de causar inúmeras alterações sobre a função de pequenas e de grandes artérias, dentre elas: diminuição do relaxamento dependente do endotélio (FORTES *et al.*, 1983; OYAMA *et al.*, 1986), aumento da resposta contrátil do músculo liso vascular (ABEBE & MACLEOD, 1990, XAVIER *et al.*, 2003) e predisposição ao desenvolvimento de eventos inflamatórios, trombóticos e ateroscleróticos (SCHONFELD, 1985; SOWERS, 1990). Além disso, alterações na produção e/ou liberação de substâncias vasoativas pelo endotélio são apontadas como um dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção destas complicações vasculares em pacientes diabéticos e em modelos experimentais de DM (TESFAMARIAM, 1994; COSENTINO, 1998; PIEPER, 1999; XAVIER *et al.*, 2003, SHI & VANHOUTTE, 2008).

1.3. O sistema vascular

O sistema circulatório é constituído por vasos que conduzem o sangue do coração aos tecidos, e destes de volta à bomba cardíaca. As paredes das artérias e das veias são formadas por três camadas concêntricas: túnica externa, túnica média e túnica íntima. A camada externa, constituída por tecido conjuntivo e algumas fibras elásticas, é chamada adventícia. Esta camada serve de suporte para os vasos. A camada média é constituída, principalmente, por fibras musculares lisas, entre as quais se interpõem quantidades variáveis de elastina, fibras reticulares, glicoproteínas e proteoglicanos. Esta camada é muito mais espessa nas artérias do que nas veias. A túnica interna é composta por um epitélio simples e plano (endotélio), por uma lâmina basal e pela lâmina elástica interna (RHODIN, 1980).

1.3.1. Contração e relaxamento do músculo liso vascular

O processo de contração das células musculares lisas é regulado principalmente por hormônios, agentes autócrinos e parácrinos (via receptor de membrana) e por ativação mecânica (estiramento) das proteínas contráteis. Mudanças no potencial de repouso da membrana, provocados por disparos de potenciais de ação ou por ativação de canais iônicos dependentes de estiramento podem também desencadear processo contrátil. Em resposta a alterações no comprimento e estiramento da fibra, as células musculares lisas podem desenvolver contrações tônicas e/ou contrações fásicas (HOROWITZ *et al.*, 1996).

A contração fásica se caracteriza por uma resposta rápida e transitória, modulada pelo sistema Ca^{+2} -calmodulina. A concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) e a sensibilidade dos elementos contráteis a esse íon regulam a contração do músculo liso vascular. Quando os níveis de Ca^{2+} intracelular aumentam, produz-se um acoplamento do mesmo à calmodulina (CaM); o complexo Ca^{2+} -CaM se une a a enzima quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que se encontra na forma inativa, formando um complexo enzimático

que cataliza a transferência de grupos fosfatos à cadeia leve da miosina (MLC₂₀), aumentando assim a atividade da ATPase da miosina e a contração muscular (GAO *et al.*, 2001) (Figura 1). Substâncias como, a norepinefrina, a endotelina-1, a angiotensina II, e a fenilefrina atuam sobre a musculatura lisa agindo em receptores específicos na membrana plasmática. Com a ativação destes receptores, o aumento na concentração intracelular de cálcio se dá através da entrada do Ca⁺² extracelular, em resposta à ativação de canais para cálcio dependentes de voltagem, bem como por canais para cálcio ativados por receptor, assim como através da liberação dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático (HOROWITZ *et al.*, 1996).

A ligação destas substâncias ao seu receptor ativa a proteína G, que corresponde a um complexo protéico composto por três subunidades α (subunidade catalítica) β e γ , levando à estimulação da Fosfolipase C, a qual é responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (SIEGEL, 1996). O IP₃ se liga a um receptor específico na membrana do retículo sarcoplasmático e estimula a liberação do cálcio ali armazenado, já o DAG ativa a PKC, que uma enzima com efeitos importantes na célula muscular lisa, como fosforilação da cadeia leve da miosina e aumento da mobilização do cálcio através do sarcolema (SIEGEL, 1996).

A ativação de proteínas G acopladas a receptores, também podem ativar a fosfolipase A₂ (PLA₂) e a biosíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (AA); além das Rho-quinases e cascatas de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK-Ras). A PKC, Rho-quinase e MAPK podem fosforilar diretamente a MLC₂₀, aumentando a atividade ATPase da miosina. Além do mais, o AA, a PKC e a Rho-quinase inibem a enzima miosina fosfatase, mantendo, desta forma, a fosforilação da MLC₂₀ (ABDEL-LATIF, 2001) (Figura 1).

No que se refere ao relaxamento do músculo liso vascular, este se dá como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por ação direta de alguma substância que leva à inibição do mecanismo contrátil. Vários mecanismos

podem participar da remoção do cálcio citossólico e envolvem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática. Por exemplo, o NO pode levar a um aumento de GMPc a partir da ativação da guanilato ciclase solúvel. Essa elevação do GMPc ativa uma PKG dependente de GMPc que medeia o efeito vasorelaxante por fosforilação de diversas proteínas intracelulares que regulam o Ca^{+2} intracelular. Assim o Ca^{+2} é transportado para o retículo sarcoplasmático, aonde é liberado para fora da célula, reduzindo o $[\text{Ca}^{+2}]_i$ resultando em vasodilatação (LANDGRAF *et al.*, 1992). A captação de Ca^{+2} pelo retículo é dependente da hidrólise de ATP, sendo mediada por uma ATPase (SERCA), que, quando fosforilada, liga-se a dois íons Ca^{+2} . Quanto ao envolvimento da membrana plasmática nesse processo, esta contém também uma Ca^{+2} -ATPase, além do que, um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, através do quais 3 íons Na^+ entram na célula em troca da saída de 1 íon Ca^{+2} (HOROWITZ *et al.*, 1996).

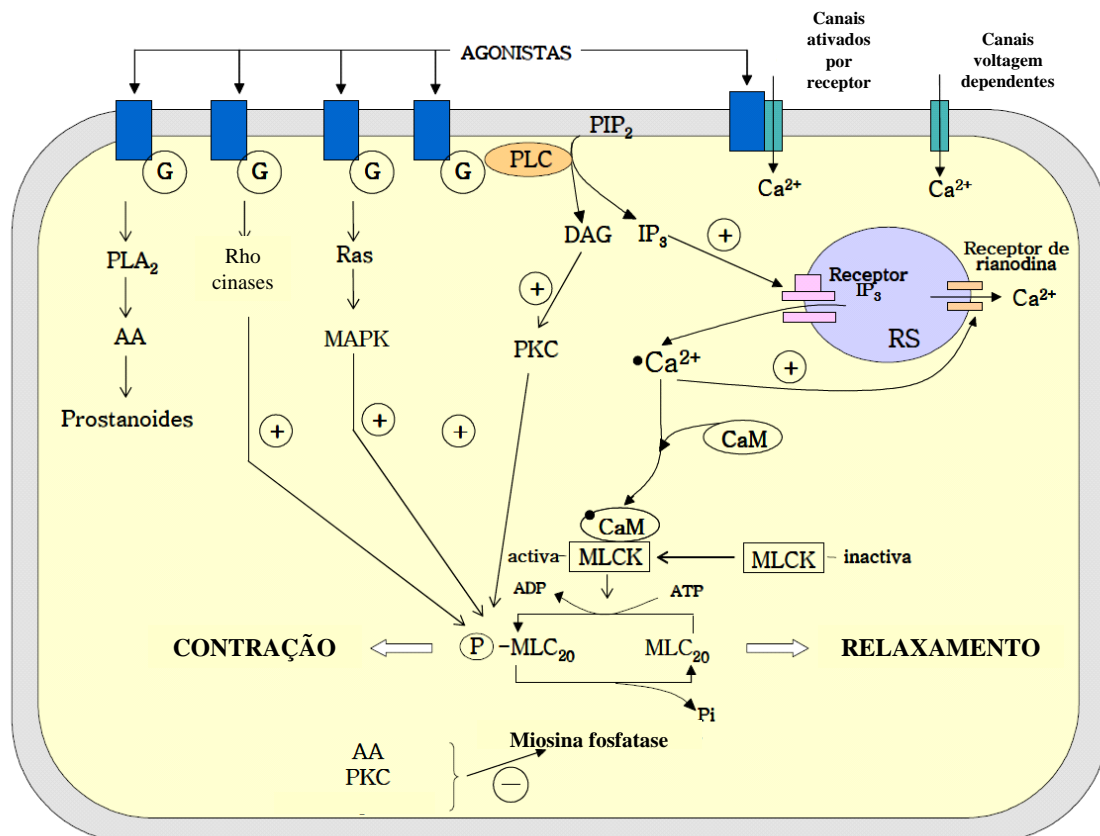


Figura 1. Mecanismos intracelulares implicados na contração muscular. AA: ácido araquidónico, CaM: calmodulina, DAG: diacilglicerol, IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato, MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos, MLC₂₀: cadeia leve da miosina, MLCK: quinase da cadeia leve da miosina, PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, PLA₂: fosfolipase A₂, PLC: fosfolipase C, PKC: proteína quinase C, RS: retículo sarcoplasmático. (Adaptado de Abdel-Latif, 2001).

1.3.2. O endotélio vascular

A partir da década de 80, a importância das células endoteliais na regulação de muitas funções vasculares começou a ganhar notoriedade. O endotélio deixou de ter apenas um papel coadjuvante de barreira entre o sangue e a parede vascular e passou a ser considerado um órgão endócrino, com capacidade de modular a motricidade vascular, a coagulação sanguínea e o crescimento vascular (FURCHGOTT, 1984). Sendo assim, a integridade do endotélio é essencial para a regulação do tônus e da parede vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tecidual e para proteção contra espasmo, trombose e aterogênese (BLATOUNI, 2001).

Entre as múltiplas funções biológicas do endotélio, as relacionadas à vasomotricidade incluem: 1) a síntese de substâncias vasodilatadoras, antiproliferativas e antiagregantes plaquetárias como, o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI₂); 2) e a síntese de substâncias vasoconstritoras, promotoras do crescimento celular e ativadoras plaquetárias, tais como, a endotelina-1, os endoperóxidos cíclicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (a prostaglandina H₂ e o tromboxano A₂), os leucotrienos, a angiotensina II e as espécies reativas de oxigênio (VIRDIS *et al.*, 2010).

1.3.2.1. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

Óxido nítrico (NO)

O NO é considerado como o mais importante fator de origem endotelial. Ele é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, por ação da enzima NO-sintase, que forma, além do NO, outra substância, a L-citrulina (PALMER *et al.*, 1988). Durante esta síntese, o grupo guanidino terminal da L-arginina se oxigena dando lugar a um composto intermediário, NG-hidroxi-L-arginina (L-OH- Arg). Na seguinte reação, a ligação C=N da LOH-Arg se oxida, formando-se NO e L-citrulina. Em ambos os passos se consome O₂ e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e são necessários flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN), tetrahydrobiopterina (BH₄) e calmodulina como cofatores (MARÍN & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997).

Muitos tipos de células são capazes de sintetizar NO. Até o presente foram identificadas três isoformas da NOS, que se diferenciam em sua expressão e atividade. Se expressam de forma constitutiva nas células (cNOS) e outra se induz por estímulos imunológicos (iNOS ou tipo II). Dentro das isoformas constitutivas se conhecem dois subtipos, eNOS (NOS III) e nNOS (NOS I). A isoforma eNOS se expressa constitutivamente nas células endoteliais, embora também tenha sido encontrada em plaquetas; nNOS se expressa em células neuronais do sistema nervoso central e periférico, e em epitélios de traquéia e brônquios. A atividade das isoformas constitutivas é dependente de Ca²⁺-CaM. A isoforma induzível (iNOS) é expressa em macrófagos, células endoteliais, neutrófilos ou células musculares lisas durante estados de inflamação ou depois de serem estimuladas com moléculas como o lipopolisacarídeo bacteriano (LPS) o citocinas como a interleucina (IL) 1β (MARÍN & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997).

Em condições fisiológicas, a produção de NO nas células endoteliais se estimula por uma variedade de agonistas e pelas forças de atrito (estresse de cisalhamento) produzido pelo fluxo sanguíneo. À semelhança dos nitratos

vasodilatadores, o NO também causa relaxamento da musculatura lisa vascular. Por ser um gás, ele se difunde para a camada muscular, onde promove aumento da produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (RAPOPORT *et al.*, 1983). A elevação dos níveis intracelulares de GMPc reduz, através da ativação da PKG, o influxo de cálcio através da membrana plasmática e aumenta sua recaptção pelo retículo sarcoplasmático. A PKG pode ainda ativar canais para K^+ , levando à hiperpolarização das células musculares lisas (Figura 2) (ROBERTSON *et al.*, 1993). Além do mais, a PKG fosforila o receptor para o IP_3 da membrana do retículo sarcoplasmático, cuja função é promover a saída de Ca^{2+} ao citoplasma, diminuindo assim sua atividade (CARVAJAL *et al.*, 2000). Por outro lado, a PKG fosforila a MLCK, inibindo assim sua atividade, o que provoca diminuição da fosforilação da MLC_{20} e, portanto, produz-se inibição da contração muscular (Figura 2) (MARÍN & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997; LINCOLN *et al.*, 2001).

O NO também atua como modulador do crescimento das células musculares lisas através da inibição da proliferação de células musculares lisas, da produção basal de colágeno, da divisão celular e da produção de matriz extracelular estimuladas pela endotelina-1 e/ou angiotensina II, além de estimular a apoptose, através de mecanismos dependentes do GMPc (POLLMAN *et al.*, 1996; RIZVI *et al.*, 1997).

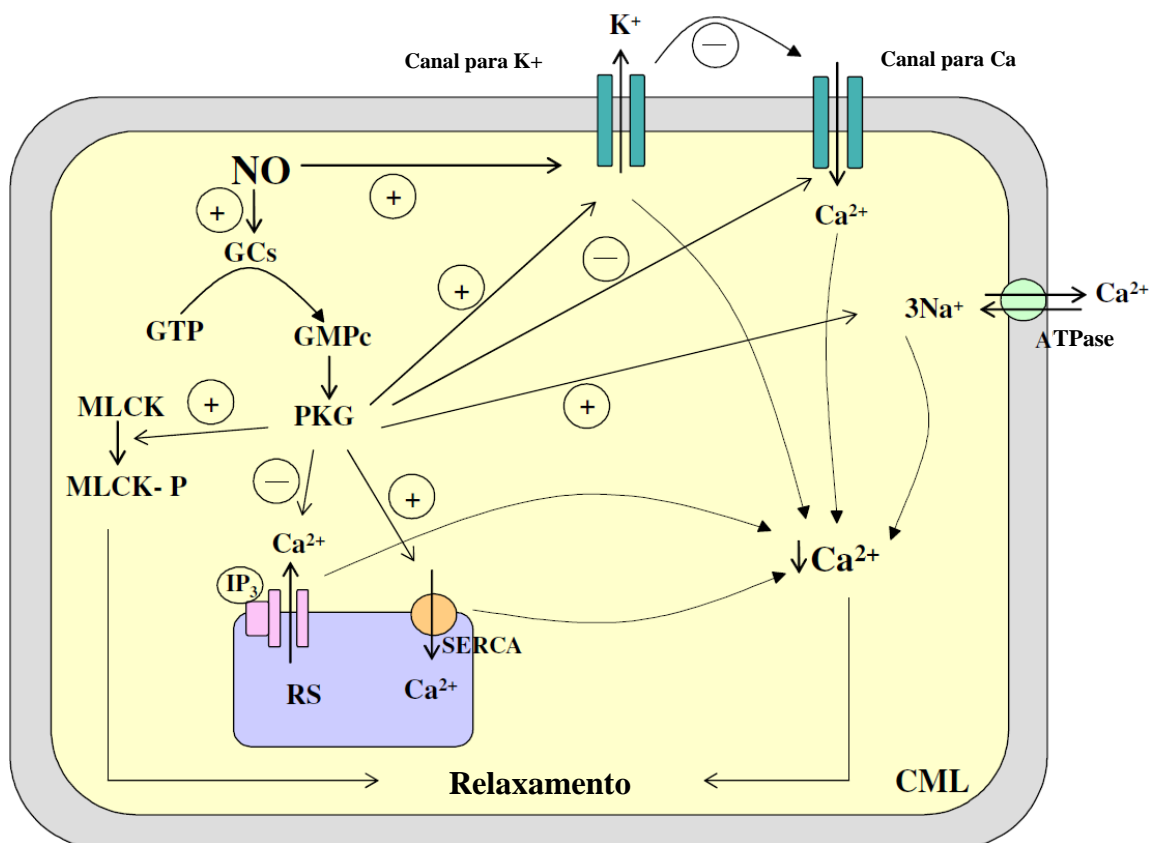


Figura 2. Mecanismos de relaxamento induzido pelo NO. GCs: guanilato ciclase solúvel, PKG: proteína quinase dependente de GMPc, RS: retículo sarcoplasmático, SERCA: Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, MLCK: quinase da cadeia leve da miosina, IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato, CML: célula muscular lisa.

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

A identidade molecular e as vias de sinalização de EDHF ainda é uma questão que gera muita discussão. Na verdade, as respostas vasodilatadoras do EDHF têm sido atribuídas a uma variedade de candidatos a este fator endotelial, como: os derivados da via do citocromo P450, o ácido epoxieicosatrienóico (EET), os produtos da lipoxigenase, o próprio NO, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dentre outros (FELETOU & VANHOUTTE, 2006). A vasodilatação induzida por esse fator ocorre sem elevação dos níveis intracelulares de GMPc ou AMPc. A hiperpolarização, fenômeno correlato ao relaxamento, ocorre devido à ativação de canais para potássio sensíveis ao ATP ou ativados por Ca^{2+} e da ativação da Na^+ , K^+ -ATPase da membrana das

células musculares lisas (CHEN *et al.*, 1989). Esse mecanismo leva à inibição da entrada de Ca^{2+} através de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem e conseqüente relaxamento da musculatura lisa (CHEN *et al.*, 1989). Os efeitos do EDHF são mais evidentes nos vasos de resistência do que nas grandes artérias (TAKAMURA *et al.*, 1999).

Prostaciclina (PGI₂)

A prostaciclina é um eicosanóide derivado do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolípidios da membrana endotelial pela fosfolipases A₂. Através da reação catalizada pela ciclooxigenase, formam-se os endoperóxidos PGG₂ e PGH₂. Este último, através da ação da prostaciclina sintetase origina a PGI₂ (Figura 3) (NEEDLEMAN *et al.*, 1986). Esta prostaglandina apresenta atividade vasodilatadora e antiagregante plaquetária; ela é muito instável e por isso se transforma espontaneamente em seu metabolito 6-ceto-PGF_{1α}. Através da estimulação dos receptores IP, a PGI₂ promove a ativação da adenilato ciclase e aumento dos níveis de AMPc, este, por sua vez induz a ativação da PKA, a qual induz inibição dos processos contráteis mediados pelo complexo Ca^{+2} -calmodulina (HATHAWAY *et al.*, 1981). Entretanto, trabalhos recentes demonstram que a PGI₂ é capaz também de induzir vasoconstrição, a qual é mediada através de receptores para o tromboxano A₂, os receptores TP (GLUAIS *et al.*, 2005, XAVIER *et al.*, 2010).

1.3.2.2. Fatores vasoconstritores derivados do endotélio

Os fatores vasoconstritores sintetizados pelo endotélio são classificados basicamente em três categorias: 1) metabólitos do ácido araquidônico (PGH₂, TXA₂, PGF_{2α}), 2) peptídeos vasoativos (ex: endotelina e angiotensina II) e 3) espécies reativas do oxigênio.

Endotelinas

Yanagisawa *et al.* (1988) foram os primeiros autores a identificar esse potente peptídeo vasoconstritor e vasopressor produzido pelas células

endoteliais. A endotelina é um peptídeo com 21 aminoácidos, existente no ser humano em três isoformas: a endotelina-1 (ET-1), a endotelina-2 (ET-2) e a endotelina-3 (ET-3) (INOUE *et al.*, 1989). O endotélio vascular produz somente a ET-1, a qual é sintetizada a partir de um precursor a pré-pró-endotelina, que sofre clivagem enzimática gerando uma forma intermediária e inativa, a *big*-endotelina. Subseqüentemente, por ação da enzima conversora de endotelina (ECE) forma-se o peptídeo ativo, a endotelina-1.

A endotelina-1 atua em receptores específicos no músculo liso vascular, os subtipos ET_A e ET_B, e nas células endoteliais atuam preferencialmente nos receptores ET_B (TIRAPELLI *et al.*, 2005). No músculo liso vascular a ativação destes receptores leva ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio e conseqüente, a vasoconstrição. Esse aumento da concentração de cálcio se dá através da entrada deste íon por canais operados por voltagem e/ou operados por receptor, além da sua liberação do retículo sarcoplasmático. Os receptores ET_A e ET_B são acoplados à proteínas G, e sua ativação induz aumento da atividade da fosfolipase C, com formação de IP₃ e DAG (SMITH *et al.*, 2003). Como conseqüência, tem-se vasoconstrição e proliferação das células musculares lisas. Já os receptores ET_B nas células endoteliais induz liberação de NO e PGI₂ (PATOCKA *et al.*, 2005).

Angiotensina II

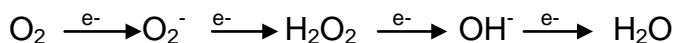
A formação da angiotensina II, a partir da angiotensina I, ocorre no plasma e em vários tecidos, como rins, cérebro, glândulas adrenais, músculo liso vascular e também nas células endoteliais. São conhecidos dois tipos de receptor para angiotensina II: AT1 e AT2 (Schiffrin *et al.*, 2009). A maioria dos efeitos biológicos da angiotensina II é mediada pela ativação de receptores AT1; alguns efeitos, geralmente opostos aos induzidos pela ativação AT1, têm sido atribuídos à ativação de receptores AT2 (TOUYZ & BERRY, 2002). Entre as múltiplas ações da angiotensina II, incluem-se contração e proliferação de células musculares lisas vasculares, aumento da contratilidade e indução de hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona e conseqüente

formação de colágeno e outros elementos da matriz extracelular, liberação de vasopressina e estimulação do sistema nervoso simpático (BERK *et al.*, 1989; KRIEGER *et al.*, 1998; MARRERA *et al.*, 2005).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

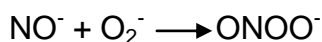
A geração de ERO, está associada ao metabolismo celular (LI *et al.*, 1997). No entanto, o aumento do estresse oxidativo tem sido associado a complicações cardiovasculares, como a hipertensão, a diabetes e a hipercolesterolemia (CAI & HARRISON, 2000; WOLIN, 2000).

Nas membranas celulares, diversas enzimas realizam suas funções utilizando o oxigênio comoceptor de elétrons e, conseqüentemente, levam a formação de ânions superóxido (O_2^-) que é produzido pela redução de uma molécula de O_2 . Estes ânions podem exercer sua ação diretamente sobre o sistema vascular, servindo de substrato para a formação de outras EROs. A partir do O_2^- se formam outras espécies reativas de oxigênio:



Como espécies reativas de oxigênio se incluem O_2^- , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-). Estes compostos possuem um elétron desemparelhado, situação que confere alta capacidade de reação.

O NO tem um elétron desemparelhado e assim podem reagir com moléculas que tenham também um elétron nesta forma (como o O_2^-), eliminando-o e produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$). Produzindo desta maneira uma reação quimicamente espontânea e irreversível (WOLIN, 2000).



Quando o O_2^- inativa o NO, o vasorelaxamento se torna difícil e induz a apoptose nas células endoteliais, provocando uma falha na continuidade do endotélio que favorece o aparecimento de fenômenos trombóticos promovendo a adesão de diferentes células no endotélio. Adicionalmente, o produto da

reação ONOO^- é um forte oxidante com importantes efeitos biológicos como nitrosilação de proteínas (MUNZEL *et al.*, 1997)

A manutenção dos níveis de EROs depende tanto de sua produção como de sua eliminação. Existem distintos sistemas enzimáticos e não enzimáticos, encarregados de eliminar os radicais livres produzidos em excesso. Assim a superóxido dismutase (SOD) a partir do O_2^- produz H_2O_2 , eliminando os ânions superóxido do meio e evitando a formação de peroxinitrito (FRIDOVICH, 1997)

Adicionalmente, o O_2^- e o H_2O_2 podem regular a atividade das metaloproteases da matriz do músculo liso vascular que degradam os proteoglicanos e o colágeno, produzindo trocas na estrutura vascular (WOLIN, 2000). Baixos níveis de EROs, estimulam o crescimento celular, por outro lado, altos níveis de EROs produzem apoptose (LUCZAK *et al.*, 2004). Além disso, as espécies reativas de oxigênio são capazes de modular as respostas contráteis. Os O_2^- e o H_2O_2 estimulam a contração mobilizando o Ca^{+2} armazenado nos depósitos intracelulares e ativam o trocador Na^+/H^+ (TOUYZ, 2000), também sendo capazes de produzir vasodilatação (CHEN *et al.*, 2007).

1.3.2.3. *Prostaglandinas vasoconstritoras*

Logo após o estudo de Robert Furchgott demonstrando nas células endoteliais a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), em resposta à acetilcolina (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980), outro estudo realizado em veias caninas isoladas, demonstrou um aumento da tensão em contrações à norepinefrina, induzidas por ácido araquidônico e trombina exógena, ao invés do relaxamento observado nas artérias correspondentes (DE MEY & VANHOUTTE, 1982).

Este resultado demonstrou a capacidade do endotélio de iniciar contrações do músculo liso subjacente, a qual era dependente do endotélio devido à liberação de substâncias difusíveis denominados fatores vasoconstritores derivados do endotélio (EDCF). Estas contrações dependente

do endotélio, induzidas pelo ácido araquidônico, eram prevenidas por inibidores da ciclooxigenase (COX), sugerindo a relação entre os EDCFs e a via metabólica desta enzima (MILLER & VANHOUTTE, 1985).

A atividade da ciclooxigenase endotelial é capaz de regular o tônus vascular momento a momento. Existem duas isoformas da ciclooxigenase denominadas COX-1 e COX-2. Ambas são heme-proteínas que apresentam a mesma potência para oxidar o ácido araquidônico em endoperóxido (PGH₂), o precursor de todas as demais prostaglandinas (Figura 3) (GARAVITO & DE WITT, 1999). Nas contrações dependentes do endotélio em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o inibidor da COX-1 (valeril salicilato) é capaz de abolir essas contrações, enquanto que os inibidores de COX-2, como o NS-398, apenas reduzem essa resposta (GE *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 2003), sugerindo que as contrações dependentes do endotélio nesses ratos são mediadas pela ativação da COX-1. Em outro estudo utilizando camundongos *knockout* para a COX-2 os efeitos da contração dependente do endotélio nas aortas desses camundongos se mantiveram, enquanto que nos camundongos *knockout* para a COX-1 esse efeito não foi observado. Demonstrando a participação indispensável da COX-1 nessa resposta contrátil (TANG *et al.*, 2005).

Entretanto sob determinadas condições como, por exemplo, no processo de envelhecimento, ou por ação de citocinas e lipopolissacarídeos (LPS) em células endoteliais e do músculo liso vascular (VAGNONI *et al.*, 1999; YAMAGATA *et al.*, 1991), a isoforma induzível COX-2 pode ser expressa, participando em parte das contrações dependentes do endotélio (SHI *et al.*, 2008). Alguns autores também têm encontrado a COX-2 expressa de forma constitutiva, podendo estar envolvida no desenvolvimento renal (ZHANG *et al.*, 1997), produzindo prostanóides vasodilatadores e citoprotetores na mucosa gástrica de humanos e coelhos (ZIMMERMANN *et al.*, 1998) ou participando na modulação da resposta vascular (HENRION *et al.*, 1997; ADEAGBO *et al.*, 2003).

As prostaglandinas estão envolvidas em várias funções chave do sistema vascular, que vão desde processos inflamatórios à regulação da pressão arterial. Como já mencionado anteriormente, o ácido araquidônico é o mais comum precursor das prostaglandinas. Estímulos como estiramento da parede vascular e agonistas, elevam a concentração de cálcio intracelular no endotélio, esse aumento de cálcio estimula a liberação de ácido araquidônico pela fosfolipase A_2 , que quando metabolizado pela ciclooxigenase gera prostanoídes vasoconstritores derivados do endotélio (EDCF). Esses prostanoídes podem ativar os receptores para o tromboxano (TP) na membrana no músculo liso vascular provocando contração (VANHOUTTE *et al.*, 2005; AUCH-SCHWEL *et al.*, 1990). Ao longo dos anos, espécies reativas do oxigênio (KATUSIC, 1989; YANG *et al.*, 2002), tromboxano A_2 (GLUAIS *et al.*, 2006), endoperóxidos (GE *et al.*, 1995), a prostaciclina (GLUAIS *et al.*, 2005), e prostaglandina $F_{2\alpha}$ (WONG *et al.*, 2009) tem sido identificados como fatores vasoconstritores dependente do endotélio derivados da ciclooxigenase.

TxA_2

O TxA_2 é sintetizado a partir da ação da enzima TxA_2 -sintetase sobre a PGH_2 derivado do ácido araquidônico. Ele é considerado um dos prostanoídes vasoconstritores mais importantes produzido na parede vascular, o qual apresenta ação agregante plaquetário e vasoconstritora (BUZZARD *et al.*, 1993). Sua ação é medida através do receptor para tromboxano (receptor TP) nas células musculares lisas, no qual eleva as concentrações de Ca^{+2} intracelular e ativa a PKC induzindo vasoconstrição (Figura 3) (MAYEUX *et al.*, 1989) A liberação do TxA_2 , como de outras prostaglandinas pelas células endoteliais, ocorre através da ação de agonistas vasoconstritores (noradrenalina, serotonina, fenilefrina, angiotensina II, endotelina-1, etc) vasodilatadores (acetilcolina, bradicinina, etc) e por estímulos mecânicos (TADDEI & VANHOUTTE, 1993).

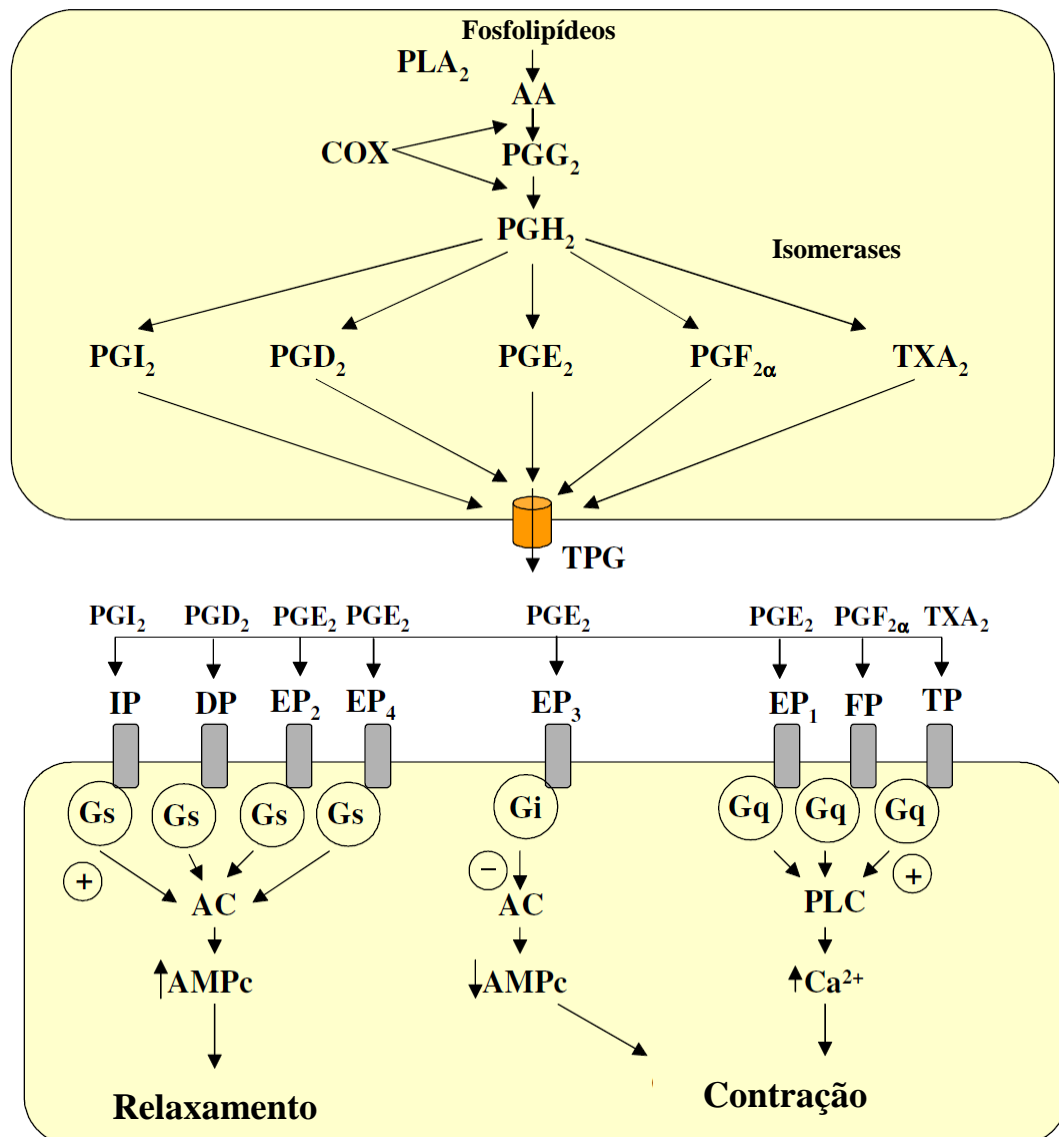


Figura 3. Síntese e mecanismos de ação de prostanóides. AA: ácido araquidônico, AC: adenilato ciclase, AMPc: Monofosfato cíclico de adonosina, DP: receptor da PGD₂, EP: receptor de PGE, FP: receptor de PGF_{2α}, IP: receptor de PGI₂, TP: receptor de TxA₂, PLA₂: fosfolipase A₂, PLC: fosfolipase C, TPG: transportador de prostaglandinas.

PGE₂

A PGE₂ resulta da ação de sua sintetase sobre a PGH₂. Ela exerce efeitos em receptores específicos (receptores EP), os quais estão presentes no

organismo na forma de quatro subtipos distintos: EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄. No sistema vascular, os subtipos EP₁ e EP₃ quando estimulados pela PGE₂ promovem vasoconstrição, a qual pode ser induzida através da ativação da via do IP₃/Ca²⁺ (receptor EP₁) ou através da diminuição dos níveis intracelulares de AMPc (receptor EP₃) por inibição da adenilato ciclase (FUNK *et al.*, 1993; COLEMAN *et al.*, 1994). A ligação da PGE₂ aos receptores EP₂ e EP₄ promovem vasodilatação através do aumento dos níveis de AMPc via ativação da adenilato ciclase (Figura 3) (COLEMAN *et al.*, 1994). Tem sido descrito que a PGE₂ também é capaz de se ligar aos receptores TP, produzindo neste caso um efeito vasoconstritor (BOS *et al.*, 2004).

PGF_{2α}

Esta prostaglandina é formada a partir da PGH₂ pela PGF_{2α}-sintetase e representa uma das mais importantes prostaglandinas vasoconstritoras derivadas do ácido araquidônico. A PGF_{2α} participa da regulação do tônus vascular ao atuar elevando as concentrações de cálcio no músculo liso vascular promovendo contração (YURA *et al.*, 1999). A PGF_{2α} age através dos receptores para PGF_{2α} (receptor FP), os quais são largamente distribuídos em vários tecidos, incluindo do sistema vascular. O receptor FP está acoplado à proteína G, e quando estimulado ativa a via do IP₃/Ca²⁺ produzindo contração da musculatura lisa (Figura 3) (PIERCE *et al.*, 1999). Sua ação vasoconstritora também pode ser mediada através de sua ligação aos receptores TP (CRACOWSKI *et al.*, 2002). Em situações de estresse oxidativo, níveis de PGF_{2α} são aumentados, os quais são gerados a partir de fosfolípidos da membrana plasmática pela ação da ciclooxigenase (MERVAALA *et al.*, 2001).

1.4. Papel do endotélio na fisiopatologia das alterações cardiovasculares ligadas ao DM.

Inúmeros estudos têm revelado que alterações da função endotelial representam um dos principais fatores envolvidos na patogênese das doenças

cardiovasculares associadas ao DM (DURANTE *et al.*, 1988; TESHAMARIAM *et al.*, 1989; HEYGATE *et al.*, 1995; PIEPER *et al.*, 1996, LINDSAY *et al.*, 1997). Estas alterações, como consequência da hiperglicemia, dão lugar a um desequilíbrio entre os fatores produzidos pelo endotélio. Nestas condições existe um predomínio de fatores vasoconstritores e de crescimento, tendência à agregação plaquetária, maior adesão de leucócitos e desenvolvimento de trombose. Esse quadro que se produz como consequência do diabetes ou de outros fatores de risco cardiovascular é conhecido como disfunção endotelial. No DM, a disfunção endotelial não é um processo homogêneo em suas características e distribuição, senão que varia em função do tempo de exposição aos níveis elevados de glicose no sangue e do leito vascular considerado (PIEPER, 1999; XAVIER *et al.*, 2003). Assim, os mecanismos responsáveis pelas alterações da função endotelial no diabetes mellitus podem ser múltiplos e incluem alterações da síntese, liberação, difusão ou degradação dos diversos fatores produzidos pelas células endoteliais.

Como comentado anteriormente, o NO é o fator de origem endotelial mais importante, devido às suas ações na manutenção da hemostasia e do tônus vascular. Por isso, a característica mais bem destacada da disfunção endotelial é uma reduzida disponibilidade do NO, causa principal de todas as alterações e desequilíbrios presentes nesta situação. Atualmente, a disfunção endotelial se avalia através da medida da vasodilatação dependente do endotélio, em resposta a agonistas que induzem a liberação de NO (RUBANYI, 1993; VANHOUTTE, 1996) ou ainda através da medida da capacidade de modulação do NO sobre a resposta contrátil induzida por agentes vasoconstritores, como os agonistas α_1 -adrenérgicos (ROSSONI *et al.*, 2002; XAVIER *et al.*, 2004). Inúmeros estudos têm demonstrado que vasos de pacientes diabéticos ou de modelos animais da doença apresentam uma menor resposta aos agentes vasodilatadores dependentes do endotélio quando comparados aos seus controles normoglicêmicos, embora a resposta aos doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio, são comparáveis (PIEPER *et al.*, 1996a,b; XAVIER *et al.*, 2003), indicando que no diabetes se produz uma

alteração da produção/ biodisponibilidade do NO mais que uma redução da resposta do músculo liso a este agente vasodilatador.

Vários mecanismos podem ser responsáveis pela menor produção de NO em portadores de diabetes, dentre eles pode-se incluir: redução da atividade e/ ou expressão da sintase de NO (HAIDARA *et al.*, 2006), menor disponibilidade de seu substrato, a L-arginina, ou redução de alguns co-fatores necessários para a sua síntese (PIEPER *et al.*, 1996b; PIEPER, 1997). Porém, na grande maioria dos casos, a síntese do NO está normal e o que sim está diminuída é a sua biodisponibilidade. Esta menor biodisponibilidade está basicamente centrada em uma maior produção de radicais livres que reduzem grandemente as propriedades bioativas deste importante fator endotelial (LANGENSTROER & PIEPER, 1992; SHI & VANHOUTTE, 2008).

Outros mecanismos também podem ser responsáveis pela menor produção de NO em portadores de diabetes, dentre eles pode-se incluir: redução da atividade e/ ou expressão da sintase de NO (HAIDARA *et al.*, 2006), menor disponibilidade de seu substrato, a L-arginina, ou redução de alguns co-fatores necessários para a sua síntese (PIEPER *et al.*, 1996; PIEPER, 1997). Porém, na grande maioria dos casos, a síntese do NO está normal e o que sim está diminuída é a sua biodisponibilidade. Esta menor biodisponibilidade está basicamente centrada em uma maior produção de radicais livres que reduzem grandemente as propriedades bioativas deste importante fator endotelial (LANGENSTROER & PIEPER, 1992; SHI & VANHOUTTE, 2008).

É importante ressaltar que a disfunção endotelial induzida pelo DM também envolve outros mecanismos além das alterações da via do óxido nítrico, como por exemplo: aumento da liberação de substâncias vasoconstrictoras derivados da via do ácido agraquidônico-ciclooxigenase (XAVIER *et al.*, 2003). A indometacina (inibidor não seletivo da COX-1 e COX-2) é capaz de inibir o aumento na contração dependente do endotélio em artérias femorais de ratos diabéticos, em que derivados da COX-1 parecem ter

um papel fundamental nesse processo (SHI *et al.*, 2007). Além disso, antagonistas de receptores TP tem sido capazes de reverter a diminuição no relaxamento dependente do endotélio em artérias de condutância de ratos diabéticos (SHIMIZU *et al.*, 1993). Além disso, esse TxA₂ derivado do endotélio contribui para uma maior vasoconstrição mediada pela endotelina-1 (ARIKAWA *et al.*, 2006) ou fenilefrina (XAVIER *et al.*, 2003) em artérias de ratos diabéticos.

1.5. Diabetes Gestacional e as complicações cardiovasculares

Nos últimos anos tem surgido na literatura um conjunto crescente de evidências experimentais que sustentam a hipótese de que distúrbios ocorridos durante o desenvolvimento fetal podem determinar na fase adulta alterações permanentes ou de longa duração na fisiologia e/ ou morfologia de órgãos e tecidos (ASHTON, 2000). Nesse sentido, o conceito de programação no desenvolvimento do feto (*fetal programming*) tem surgido para tentar explicar o aparecimento dessas alterações que podem conduzir a doenças mais tardiamente após o nascimento. Essa programação pode ser definida como um fenômeno que ocorre a partir de um estímulo, durante um momento chave na formação dos sistemas vitais para a sobrevivência do indivíduo, ou seja, na fase intra-uterina e/ou perinatal. Alterações do ambiente uterino nesses períodos podem acarretar alterações importantes na estrutura e função do corpo organismo, aumentando os riscos de desenvolvimento de algumas doenças, como as doenças metabólicas e cardiovasculares.

Desnutrição intra-uterina, restrição de crescimento e prematuridade são duas das influências que podem induzir tais efeitos (SILVERMAN *et al.*, 1991). Ambos causam baixo peso ao nascer, e compartilham de algumas conseqüências fisiopatológicas em longo prazo, incluindo a hipertensão arterial e DM2. A hipótese do fenótipo poupador (PLAGEMANN *et al.*, 1997) propõe respostas metabólicas e fisiológicas protetoras à desnutrição no início do desenvolvimento do feto, permitindo a formação de órgãos vitais como o cérebro e assim possibilitando a sobrevivência do organismo. Entretanto, na

vida pós-natal a grande oferta de alimentos com alto teor calórico presenciado principalmente em países ocidentais, o fenótipo poupador vivido dentro do útero torna-se desvantajoso, onde pessoas que apresentam baixo peso ao nascer estão mais propensas a adquirirem DM2 e síndrome metabólica mais tardiamente.

Trabalhos publicados pelo grupo do Dr. David Barker foram os primeiros a demonstrar o envolvimento de distúrbios ocorridos durante a fase intra-uterina no desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER *et al.*, 1986; 1989; 1998; 1994). Especificamente, Barker e seus colaboradores evidenciaram que a distribuição geográfica da taxa mortalidade neonatal na Inglaterra e no País de Gales no início do século XIX era próxima da distribuição da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares setenta anos mais tarde. Devido ao fato de que a mortalidade neonatal no início do século XIX era atribuída ao baixo peso após o nascimento, Barker sugeriu que fatores iniciados durante a vida fetal, e que retardam o crescimento, poderiam “programar” ou definitivamente alterar a estrutura e/ ou a fisiologia de sistemas ligados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na idade adulta (BARKER, 1998). Além disso, com base na associação entre peso corporal após o nascimento e a pressão arterial na vida adulta publicada em 1985 por Wadsworth *et al.*, Barker propôs que influências do ambiente fetal poderiam também alterar a pressão arterial na vida adulta (BARKER *et al.*, 1989). Vários estudos epidemiológicos atualmente suportam essa relação inversa entre peso corporal após o nascimento e a hipertensão arterial (LAW *et al.*, 1996; HUXLEY *et al.*, 2000). Além disso, uma elevação da pressão arterial também é encontrada em crianças com baixo peso corporal (LAW *et al.*, 2002). Estas observações serviram como base de sustentação da “Hipótese de Barker” que postula que condições adversas ocorridas no útero, como a desnutrição, podem desencadear um retardo do crescimento e a uma “programação fetal” da hipertensão arterial e de outras doenças cardiovasculares na vida adulta.

Embora inicialmente grande parte dos estudos experimentais tenha dado maior ênfase ao efeito da desnutrição materna sobre a “programação fetal” de

algumas doenças na vida adulta, já existem hoje alguns estudos demonstrando que a exposição fetal à hiperglicemia materna tem uma contribuição importante para o aparecimento de doenças desde a vida intra-uterina até a vida adulta (DABALEA *et al.*, 2000; WEISS *et al.*, 2000). O diabetes materno aumenta os riscos de prematuridade, aborto e de má-formação congênita. Chugh, *et al.* (2003) demonstraram que uma exposição contínua do feto a níveis elevados de glicose pode resultar em embriopatia diabética, que é caracterizado por múltiplos defeitos congênitos ao nascer, incluindo o sistema nervoso, cardiovascular, esquelético, e renal. Estas más formações resultam de defeitos na organogênese, incluindo falha no fechamento do tubo neural e anormalidades urogenitais (LUCAS *et al.*, 1997; LYNCH *et al.*, 1997; NOLD *et al.*, 2004;).

Para decifrar a fisiopatologia do diabetes materno e o impacto desta nos descendentes, vários estudos experimentais têm sido realizados (ROBINSON *et al.*, 1988; HOLEMANS *et al.*, 1999; GRILL *et al.*, 2001). Ross *et al.* (2007) sugerem que um ambiente intra-uterino exposto a níveis elevados de glicose pode interferir no desenvolvimento fetal alterando os mecanismos de regulação homeostática em longo prazo. Essa exposição durante a gravidez leva a um aumento da susceptibilidade a complicações vasculares e metabólicas na fase adulta. Indivíduos submetidos ao diabetes gestacional podem ter conseqüências fisiopatológicas, como obesidade, hipertensão arterial, DM2 e complicações vasculares na fase adulta. Grill *et al.* (1991) e Fujisawa *et al.* (2007) demonstraram o desenvolvimento de intolerância a glicose e resistência a insulina em ratos com 4 e 6 meses de idade provenientes de ratas diabéticas. Manderson *et al.* (2002) demonstraram no plasma de ratos oriundos de ratas diabéticas um aumento na concentração de moléculas de adesão, alterações metabólicas e uma maior predisposição a doenças vasculares. Além disso, Zandi-Nejad *et al.*, (2006) demonstraram neste mesmo modelo uma diminuição no número de néfrons, o que aumentaria nestes animais a susceptibilidade ao desenvolvimento de hipertensão arterial e outras complicações renais. Neste sentido, Amri *et al.* (1999) demonstraram que em ratos, a exposição do feto à hiperglicemia materna diminui a nefrogênese, reduzindo do número de néfrons

e predispondo a prole ao desenvolvimento de insuficiência renal crônica e hipertensão arterial na vida adulta. Estudos mais recentes de Rocha *et al.* (2005) e Cavanal *et al.* (2007) demonstraram que ratos adultos normoglicêmicos provenientes de ratas diabéticas apresentam prejuízo da função renal e hipertensão arterial. Outros estudos têm demonstrado que filhos de mães diabéticas apresentam elevada incidência de intolerância à glicose, resistência à insulina e obesidade na vida adulta (BOLOKER *et al.*, 2002; FETITA *et al.*, 2006), o que também predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares na vida adulta.

Como enfatizado anteriormente, o efeito da hiperglicemia sobre o sistema vascular representa um papel chave para desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos diabéticos, o que torna de grande relevância o entendimento dos mecanismos responsáveis por estas alterações. Existem atualmente na literatura muito poucos estudos analisando os efeitos da exposição à hiperglicemia materna durante a vida intra-uterina e perinatal sobre a função vascular na vida adulta, assim como sua contribuição para o desenvolvimento de algumas enfermidades como a insuficiência renal crônica e a hipertensão arterial na vida adulta.

Rocha *et al.* (2005), demonstraram que artérias mesentéricas de ratos adultos provenientes de ratas com diabetes induzido pela estreptozotocina apresentam redução do relaxamento dependente do endotélio e que este efeito poderia estar relacionado ao o desenvolvimento de hipertensão arterial. Porém, o mecanismo responsável por este prejuízo não foi estudado. Da mesma forma, Holemans *et al.* (1999) demonstraram um prejuízo da função endotelial em artérias mesentéricas de ratos adultos provenientes de ratas com diabetes induzido pela estreptozotocina, porém sem alterações na pressão arterial. A razão para esta discrepância com relação à pressão arterial não é totalmente conhecida, entretanto o fator idade pode ter influenciado os resultados obtidos nestes estudos, uma vez que, Rocha *et al.* (2005) utilizaram ratos com 12 meses de idade enquanto Holemans *et al.* (1999) utilizaram animais com apenas 3 meses de vida, o que sugere que a idade tem um papel importante

no desenvolvimento de hipertensão arterial nestes animais. Isto faz com que este parâmetro seja mais bem avaliado nesse modelo experimental e correlacionado com as alterações vasculares presentes.

Estudos mais detalhados sobre os mecanismos causadores da hipertensão arterial são de grande importância, uma vez que ela é um determinante crítico para o desenvolvimento e progressão das complicações macrovasculares e microvasculares do diabetes mellitus e também em indivíduos que foram expostos à hiperglicemia materna durante a vida intrauterina. Na patogênese de muitas doenças cardiovasculares e em particular na hipertensão arterial, as artérias de resistência apresentam um papel de destaque (FOLKOW, 1990; MULVANY, 1987), e alguns autores têm inclusive sugerido que o desenvolvimento de anormalidades nestes vasos poderia ser causa primária do processo hipertensivo (KORNER & ANGUS, 1997). Além disso, é importante ressaltar que uma vez instaladas estas alterações vasculares também predis põem o indivíduo a outras complicações que são comuns em pacientes com diabetes mellitus, como a isquemia miocárdica (HASDAI *et al.*, 1997), o acidente vascular cerebral (COLLINS *et al.*, 1978) e a insuficiência renal crônica (KLAHR & MORRISSEY, 2003). Desta forma, nos últimos anos, estudos com vasos de resistência (artérias com diâmetro interno inferior a 300 μm) têm obtido cada vez mais notoriedade. Por outro, especial atenção deve ser dada também à participação das grandes artérias na patogênese das complicações cardiovasculares associadas ao diabetes, uma vez que são elas os principais alvos para o desenvolvimento de alterações macrovasculares aterotrombóticas que correspondem a uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos e possivelmente podem contribuir para os riscos de doença cardiovascular em indivíduos expostos ao diabetes materno.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Analisar possíveis alterações da pressão arterial e da reatividade vascular em artéria mesentérica superior e aorta torácica de ratos adultos provenientes de ratas diabéticas pela injeção de estreptozotocina, os possíveis mecanismos envolvidos nos ajustes encontrados nestes vasos e a sua repercussão em diferentes idades.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Avaliar o efeito do diabetes materno sobre a pressão arterial de ratos adultos com 3, 6 e 12 meses de idade;

2.1.2. Avaliar nestes ratos possíveis alterações sobre a tolerância à glicose e sobre a sensibilidade à insulina.

2.1.3. Avaliar se o diabetes materno produz alterações no relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias mesentéricas e em aorta torácica de ratos adultos com 3, 6 e 12 meses de idade e os possíveis mecanismos envolvidos;

2.1.4. Estudar nestas artérias se o diabetes materno produz alterações da resposta contrátil induzida pela fenilefrina e avaliar a participação do endotélio e alguns de seus fatores vasoativos sobre as possíveis alterações da resposta contrátil a esse agonista;

ARTIGO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO *VASCULAR PHARMACOLOGY*.

COX-2-derived prostaglandins contribute to endothelial dysfunction in aorta from offspring of diabetic rats

de Queiroz D.; Ramos-Alves F.; Santos-Rocha J.; Duarte G. and Xavier FE.

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

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

Abstract

Offspring of diabetic mothers (O-DR) have an increased risk of developing cardiovascular diseases. We determined how diabetes in pregnancy can affect vascular function in the offspring and the influence of age in this effect. Blood pressure and endothelium-dependent relaxation in the offspring were analyzed at 3, 6 and 12 months. O-DR developed hypertension from 6 months of age compared to offspring of control mothers (O-CR). Acetylcholine elicited relaxation that was impaired only in aorta 12-month old O-DR. This impairment on acetylcholine response was accompanied by hyperreactivity to phenylephrine. COX-2 inhibition (NS-398) normalized the response to acetylcholine and phenylephrine in aorta from 12-month-old O-DR. TP receptor blockade (SQ29548) or TxA₂ synthesis inhibition (furegrelate) increased acetylcholine relaxation and decreased contraction to phenylephrine in O-DR group. In presence of SQ29548 plus AH6809, acetylcholine response was restored and phenylephrine contraction was reduced to levels observed by COX-2 inhibition. These results demonstrate that gestational diabetes produces cardiovascular and metabolic alterations in adult offspring, such as glucose intolerance, insulin resistance and hypertension, whose are influenced by age. The increased blood pressure observed in O-DR group can be attributed, at least in part, to vascular alterations, which seems to be related to increased synthesis or release of COX-2-derived contractile factors, such as TxA₂ and PGE₂.

Keywords: *Maternal diabetes; endothelial dysfunction; COX-2.*

INTRODUCTION

In recent years has appeared in the literature a growing of experimental evidence supporting the hypothesis that disturbances during fetal development may lead to long-term changes in physiology of organs and tissues [1]. In this sense, the “fetal programming” is an emerging concept that links environmental conditions during embryonic and fetal development with risk of chronic diseases later in life, including coronary heart disease, stroke and hypertension [2,3]. This concept was first proposed by Barker and colleagues, who evidenced an inverse relationship between with low birth weight and cardiovascular diseases in adulthood [4]. However, other maternal status that produces adverse environment to fetal development, including chronic hyperglycemia, also increases the risk of metabolic and cardiovascular diseases in the offspring.

The offspring of diabetic mothers are insulin-resistant and present an increased risk of hypertension in adulthood, which has been attributed to reduction in nephron number [5,6], impaired barorreflex function [7] and altered vascular function [3,8].

These vascular abnormalities are characterized by alterations in balance between vasoconstrictor and vasodilator prostanoids that impaired endothelial function [8,9] and increased contractile responses to vasoconstrictor agents, such as noradrenaline and serotonin [9,10]. COX enzymes catalyzes the conversion of arachidonic acid to endothelial prostanoids that contributes to vascular tone regulation [11]. Two isoforms of COX have been identified in

mammalian cells. COX-1 is constitutively expressed in most tissues, such as vascular endothelial cells, and is involved in homeostasis maintenance. Although COX-2 is expressed at low or undetectable level, but is readily upregulated by inflammatory, mitogenic and physical stimuli. Vascular COX-2 expression has been reported in several pathological conditions associated with cardiovascular risk, such as hypertension, diabetes, atherosclerosis, obesity and aging [11–14]. In addition to its contribution to impairment of the endothelium-dependent relaxations [15,16], COX-2-derived prostanoids have also been recognized as an important factor causing increased contraction in isolated arteries from hypertensive [13] and diabetic [17] rats. In this sense, we [18,19] and others [20] have demonstrated that in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats the COX mediated impairment of endothelial function is accompanied by hyperreactivity to noradrenaline. In aorta from offspring of diabetic rats the contribution of these prostanoids to endothelial function is still unknown. Once aorta artery is the main conductance blood vessel, this study has important implications with regard to regulation of homeostasis vascular and blood pressure in offspring of diabetic rats.

In view of that, the present experiments were designed to study whether *in utero* exposure to maternal hyperglycemia alters endothelial function and contractile response to phenylephrine in aorta from adult offspring as well as the possible role of COX-2-derived prostanoids in this effect. The influence of age on these alterations in the current study we also investigated.

METHODS

All procedures used in this study were approved and performed in accordance with guidelines of the Ethics Committee of the *Centro de Ciências Biológicas* of *Universidade Federal de Pernambuco* and conformed to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (National Institutes of Health Publication No.85-23, revised 1996). Wistar rats from colonies maintained at the Animal Quarters of *Departamento de Fisiologia e Farmacologia* of *Universidade Federal de Pernambuco*. Rats were housed at a constant room temperature humidity and a light cycle (12:12h light-dark), with free access to standard rat chow and tap water.

Animals

Virgin female Wistar rats were kept in cages with male rats in a 3:1 ratio to be mated. Evidence of copulation was accomplished by the presence of sperm in vaginal smear and 24 hours after that observation was considered the first day of gestation. Seven days after the onset of pregnancy, diabetes was induced by single injection of streptozotocin (50 mg / kg, ip). Control animals received an equal volume of vehicle (citrate buffer). In these animals, blood glucose was measured 48 h after injection of streptozotocin or citrate buffer, to confirm whether or not the induction of DM, only the rats that had severe hyperglycemia above 200 mg/dl were used. During the lactation, the offspring was restricted to six animals per rat. This study used only male rats with 3, 6 and 12 months from diabetic rats (O-DR) and control (O-CR).

Glucose tolerance and Insulin resistance

The oral glucose tolerance test was performed according to a standard protocol. After a 10 h fast, a single oral dose ($2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight) of glucose was delivered. Blood glucose was then measured from the tail vein just before, and 30, 60, 90 and 120 min after glucose injection, using test strips and reader (ACCU-CHEK®, Roche Diagnostics). After 48 h, the animals were subjected to a new 10 h fast for assessment of insulin sensitivity by insulin tolerance test. For this, regular insulin was administered i.p. at the dose of $1.5 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight. Blood glucose was determined before and 15, 30, 45 and 60 min after insulin administration.

Evaluation of blood pressure

The animals were anesthetized with a mixture of ketamine, xylazine and acetopromazin ($64.9, 3.2,$ and $0,78 \text{ mgkg}^{-1}$, respectively, ip.) The right carotid artery was cannulated with polyethylene catheter (PE-50) filled with heparinized saline. After 24h, mean arterial pressure were measured in conscious animals by a pressure transducer (model MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) and recorded using an interface and software for computer acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).

Vascular Reactivity Study

The thoracic aorta artery was carefully removed and placed in cold oxygenated Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB). The buffer consisted of (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO_3 25; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5, glucose 11, KH_2PO_4 1.2, 1.2 and EDTA $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01) Arterial segments were mounted

between two steel hooks in isolated tissue chambers containing 5 ml of gassed (95% O₂ and 5% CO₂) KHB, at pH 7.4 and 37°C. The thoracic aortic rings were subjected to a resting tension of 1 g, which was readjusted every 15 min during 45 min of stabilization, period before drug administration. The isometric tension was recorded by using an isometric force displacement transducer (Leticia Scientific Instruments, TRI-210, Barcelona, Spain) connected to a data acquisition system (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, Australia).

Protocols

After a 45 min equilibration period, each arterial segment was exposed to potassium chloride (KCl, 75 mM) to assess its maximum contractility. After a washout period, the presence of the vascular endothelium was confirmed by the ability of 1 mM acetylcholine (ACh) to relax segments precontracted with phenylephrine at a concentration that produced approximately 50–70% of the contraction induced by KCl. The segments were rinsed with KHS for 1h and then a cumulative ACh concentration-response curve (0.1 nM to 3 mM) was obtained in the phenylephrine precontracted segments. After 60 min, cumulative concentration–response curves for phenylephrine (10 nM - 0.1 mM) were generated. Endothelium-independent relaxation was studied by evaluating relaxation to sodium nitroprusside (1 nM–10 mM) in arteries previously contracted with phenylephrine.

The possible role of COX-derived metabolites was investigated in segments from CON and STZ rats. Arteries were pre-incubated with either indomethacin (a COX-1 and COX-2 inhibitor, 10 mM), SC-560 (a COX-1

inhibitor, 1 mM), NS-398 (COX-2 inhibitor, 10 mM), SQ29548 [TxA₂ receptor (TP) antagonist, 1 mM], Furegrelate [synthesis inhibitor of the TxA₂, 1mM], AH6809 [PGE₂ receptor (EP1, EP2 and EP3) antagonist, 30 mM] or AL8810 [PGF_{2a} receptor (FP) antagonist, 10 mM], before generating concentration-response curves to Ach and phenylephrine. All drugs were added 30 min before the concentration-response curve to Ach and Phe.

Statistical analysis

All the results are expressed as mean \pm SEM of the number of rats used in each experiment. Differences were analyzed using Student's t-test, one way or two-way ANOVA. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's post hoc test was used to compare individual's means (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Body weight, Glucose tolerance and Insulin resistance

Dams injected with streptozotocin had severe hyperglycaemia on gestational days 14 and 21 compared with control dams (control 852 ± 24 vs. diabetic 4820 ± 225 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, t-test: $P<0.05$). Gestation occurred normally, and the rats delivered spontaneously at term (21 days of gestation). Diabetic dams gave birth to fewer pups than the controls (control: 10 ± 1 vs. diabetic 6 ± 2 pups per litter; t-test: $P<0.05$). As shown in Table 1, mean body weight was significantly lesser in O-DR than O-CR. Blood glucose levels were similar in O-CR and O-DR (Table 1). Oral glucose tolerance test was performed at 3 and 12 months of age. Blood glucose levels were higher in both 3 and 12-month-old O-DR at 30 min compared with age-matched O-CR (results not shown) and remained increased until the time of 120 min (3-month-old rats: O-CR, 1050 ± 49 vs. O-DR, 1280 ± 45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, t-test: $P<0.05$; 12-month-old rats: O-CR, 1060 ± 32 vs. O-DR, 1420 ± 23 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, t-test: $P<0.05$). Results from the insulin tolerance test demonstrated significant insulin resistance among the O-DR, as they presented a higher blood glucose from 15 min to 60 min after an insulin injection (blood glucose 60 min after the insulin injection; 3-month-old rats: O-CR, 350 ± 40 vs. O-DR, 470 ± 23 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, t-test: $P<0.05$; 12-month-old rats: O-CR, 330 ± 15 vs. O-DR, 572 ± 32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, t-test: $P<0.05$).

Assessment of mean arterial pressure

O-DR presented higher BP than O-CR. Although the mean arterial pressure of 3-month-old rats was similar in both groups (O-CR: 97.5 ± 2.54 vs. O-DR: 104 ± 8.40 mmHg, t-test, $P > 0.05$), it was significantly increased in O-DR at both 6 (O-CR: 105 ± 4.70 vs. O-DR: 132 ± 5.30 mmHg, t-test, $P < 0.05$) and 12 months (O-CR: 102 ± 5.10 vs. O-DR: 149 ± 3.70 mmHg, t-test, $P < 0.05$) compared with O-CR. The heart rate was similar in all O-DR groups compared with their respective age-matched O-CR (results not shown).

Vascular function in adult offspring rats

KCl (75 mM) evoked similar contractions in vessels from both O-DR and age-matched O-CR (3-month-old rats, O-CR: 2.03 ± 0.11 vs. O-DR: 1.72 ± 0.25 mN·mm⁻¹; 6-month-old rats, O-CR: 2.03 ± 0.09 vs. O-DR: 2.13 ± 0.11 mN·mm⁻¹; 12-month-old rats, O-CR: 2.06 ± 0.06 vs. O-DR: 2.11 ± 0.14 mN·mm⁻¹; ANOVA, $P > 0.05$).

ACh induced cumulative concentration and endothelium-dependent relaxation in phenylephrine-contracted arteries from 3, 6 and 12-month-old O-CR and O-DR (Figure 1). Between O-CR and O-DR groups with 3 and 6 months of age, there were no significant differences in endothelium-dependent relaxation induced by ACh (Figure 1A and Figure 1B). However, in aorta from 12-month-old O-DR this response was decreased compared to its respective control age-matched O-CR (Figure 1C). Endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside remained unmodified in all O-DR groups compared to age-matched O-CR (Figure 2).

The exposure to maternal diabetes promoted an increase in the contractile response to phenylephrine in a aorta from 12-month-old O-DR compared to its respective O-CR, while in 3- and 6-month-old ODR this response remained unmodified (Figure 3). In arteries without endothelium the contractile responses produced by phenylephrine were similar in all groups studied (data not shown).

Role of COX-derived products

In 12-month-old O-CR, ACh-induced vasodilatation was not modified by indomethacin or NS-398 (Figure 4A). In contrast, the altered response to ACh in arteries from 12-month-old O-DR was normalized by either indomethacin or NS-398, but not by SC-560, (Figure 4B). In aorta from 12-months old rats, incubation with either the non selective COX inhibitor indomethacin or the specific COX-2 inhibitor NS-398 decreased the contractile response to phenylephrine only in O-DR (Figure 4D). In 3 and 6-month-old O-CR and O-DR, the relaxation to acetylcholine and contraction to phenylephrine did not change in presence of indomethacin or NS-398 (results not shown).

Pharmacological identification of prostanoids derived from COX-2

In the aorta from 12-month-old O-DR, preincubation with SQ29548 or furegrelate increased relaxation to ACh, but not in the same magnitude observed in the presence of COX inhibitors (indomethacin and NS-398) (Figure 5A). In presence of AH6809 + SQ29548, relaxation to acetylcholine was increased at the same levels of that observed in the presence of indomethacin or NS398. (Figure 5B). The presence of AL8810 did not induce any additional

effect on relaxation induced by ACh. In 12-month-old O-DR, response to phenylephrine was normalized when aorta was incubated with SQ29548 plus AH6809, similar to observed in presence of NS-398. AL8810 failed to decrease the effect of SQ29548 plus AH6809 (Figure 5D).

DISCUSSION

Hyperglycemia is a known pathogenic factor with long-term consequences of diabetes mellitus. During fetal development, maternal hyperglycemia poses a risk of prematurity, miscarriage and congenital malformations at birth, including the nervous, cardiovascular, skeletal and renal systems [21]. Moreover, as already mentioned before, exposure to hyperglycemia during the fetal period is an important contributor to the emergence of chronic diseases, from intrauterine life to adulthood [5, 7].

Low birth weight as consequence of adverse intra-uterine environment is associated with an increased risk of hypertension [22,23]. This might result from either maternal undernutrition induced by protein restriction during pregnancy or inadequate delivery of nutrients to the fetus [22,23]. In line with these evidences, Canavan & Goldspink [24] demonstrated that diabetic pregnancy induces suppression in fetal growth, which is associated with reduced protein synthesis. In the present study, O-DR had significant lower birth weights compared to O-CR. In addition, arterial blood pressure was significantly increased at 6 and 12 months of age in O-DR, although no changes were detected in 3-month-old O-DR. This blood pressure elevation was associated with a marked reduction in body weight, present since birth. It has been reported that the severity of maternal diabetes influences fetal growth and that the phenotype appears to vary according to age at the time of analysis. Thus, maternal diabetes induced by STZ produces both large [25,8] and small [26,27]. offspring weight. The heavier offspring tend to come from dams with mild

hyperglycemia, whereas more severe hyperglycemia predicted underweight offspring [7]. Thus, results presented here are consistent with previous studies using STZ to induce more severe gestational diabetes [9,19,21].

Hyperglycemia in pregnancy also leads to insulin resistance in the offspring [10,,30], which also have been associated with the development of hypertension [30]. Results showing reduced insulin sensitivity in adult offspring from diabetic mothers are derived mainly from studies that involved severe maternal hyperglycemia [10,26,31]. Indeed, although no offspring group developed pre-diabetes or diabetes during the follow-up period, O-DR manifest insulin resistance and glucose intolerance at 3 months of age and a further impairment of these parameters at 12 months of age. Insulin resistance leads to vasoconstriction, inflammation and thrombosis, which occasionally produces hypertension [32].

Mechanisms of the hyperglycemia-programmed hypertension are complex and involve renal, neural and vascular mechanisms [25,10,28-9]. Previous studies have demonstrated a reduced endothelium-dependent relaxation by dilators in both conductance [10,27] and resistance [8,9] arteries from adult offspring of diabetic mothers compared to those from non-diabetic mothers. This response has been accompanied, or not, by hypertension. Holemans *et al.* [9] demonstrated impaired relaxation to ACh or bradykinin in arteries from 3-month-old offspring of diabetic dams, but without changing in blood pressure. On the other hand, Rocha *et al.* [8] demonstrated increased blood pressure in 12-month-old diabetic offspring, which was associated with

reduced endothelium-dependent relaxation and impairment of renal function.. Therefore, the phenotype of diabetic offspring rats appears to vary according to age at the time of analysis.

Based on these evidences, we analyzed whether in O-DR, the hypertension for longer periods as 6 and 12 months was accompanied by alterations in vascular function and also whether these alterations differ with age. As previously reported by Nehiri et al. [25], this study shows that although the blood pressure in 3-month-old rats was similar in both groups, it was increased among 6 and 12 months of age rats in O-DR compared to those in O-CR group. Our results also demonstrate that in aorta from 12-month-old O-DR the relaxation to ACh was impaired while contraction to phenylephrine was increased. Since relaxation to sodium nitroprusside remained unchanged in arteries from O-DR group, it suggests that the loss of endothelial function is not produced by a lower responsiveness of smooth muscle to nitric oxide.

The results presented here also demonstrate that both the inhibition of COX 1 and 2 (indomethacin) and COX-2 (NS-398) increased the relaxation to acetylcholine and reduced contraction to phenylephrine only in arteries from O-DR group. These results point to an increased participation of vasoconstrictor prostanoids in the observed vascular changes. The fact that the effect of indomethacin (nonselective COX-1 and 2) and NS-398 (selective COX-2) were similar, suggesting that these prostanoids released are derived from COX-2. Blockade of TP receptor (SQ29548) or inhibition of TxA₂ synthesis (furegrelate), caused a similar increase in endothelium-dependent relaxation and reduced

phenylephrine contraction in aorta from 12-month-old O-DR, suggesting the involvement of TxA_2 in these vascular changes. However, the effect of SQ29548 and furegrelate was lower than that observed with NS-398, which suggests the participation of other prostanoids in the vascular changes observed in O-DR group.

In addition to TxA_2 , PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ might produce vasoconstriction through EP and FP receptor binding, respectively [33]. PGE_2 can activate four different types of receptors, which may result in either vasodilation (by activating EP_2 and EP_4 receptors) or vasoconstriction (by activating EP_1 and EP_3 receptors) [33]. In the present study, we have found that in aorta from 12-month-old O-DR, co-incubation with SQ29548 plus AH6809 (the EP_1 , EP_2 and EP_3 receptors antagonist) restored the relaxation to ACh. The co-treatment with SQ29548 plus AH6809 plus AL-8810 (a FP receptor antagonist) did not induce any additional effect on relaxation to acetylcholine or contraction to phenylephrine, ruling out the participation of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in the vascular alterations observed... These findings are in accordance with previous results showing that COX-2 induces TxA_2 , PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ production under inflammatory conditions [13,34-35] and support the possible relevance of these prostanoids in cardiovascular changes induced by exposure in utero to hyperglycemia.

In conclusion, results obtained here reinforce the concept that gestational diabetes produces cardiovascular and metabolic alterations in adult offspring, such as glucose intolerance, insulin resistance and hypertension, whose are influenced by age. The increased blood pressure observed in O-DR group can

be attributed, at least in part, to vascular alterations, which seems to be related to increased synthesis or release of COX-2-derived contractile factors, such as TxA₂ and PGE₂.

REFERENCES

1. ASHTON N. Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res.* 33: 731-740, 2000.
2. BARKER DJ, BAGBY SP: Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. *J Am Soc Nephrol* 16: 2537–2544, 2005.
3. MCMILLEN IC, ROBINSON JS: Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571–633, 2005.
4. BARKER DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 23: 588–595, 2004.
5. CHEN YW, CHENIER I, TRAN S, SCOTCHER M, CHANG SY. Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. *Pediatr Nephrol* 25: 1319–1329, 2010.
6. AMRI K, FREUND N, VILAR J, MERLET-BE´NICHOU C, LELIE`VRE-PE´GORIER M. Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes* 48: 2240–2245, 1999.
7. WICHI RB, SOUZA SB, CASARINI DE, MORRIS M, BARRETO-CHAVES ML. Fetal Physiological Programming Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 1129–1133, 2005.

8. ROCHA SO, GOMES GN, FORTI AL, FRANCO MC, FORTES ZB, et al. Long term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in the rat male offspring. *Pediatr Res.* 58: 1274–1279, 2005.
9. HOLEMANS K, GERBER RT, MEURRENS K, DE CLERCK F, POSTON L, VAN ASSCHE FA. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia.* 42: 81-89, 1999.
10. SEGAR EM, NORRIS AW, YAO JR, HU S, KOPPENHAFFER SL. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. *Clin Sci.* 117: 129–138, 2010.
11. FÉLÉTOU M, HUANG Y, VANHOUTTE PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 164: 894–912, 2011.
12. HELMERSSON J, VESSBY B, LARSSON A, BASU S. Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation.* 109: 1729–1734, 2004.
13. ALVAREZ Y, BRIONES AM, BALFAGÓN G, ALONSO MJ, SALAICES M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 23: 767–777, 2005.
14. BAGI Z, ERDEI N, TOTH A, LI W, HINTZE TH. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-

derived constrictor prostaglandins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 1610–1616, 2005.

15. BLANCO-RIVERO J, CACHOFEIRO V, LAHERA V, ARAS-LOPEZ R, MARQUEZ-RODAS I, et al. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 46: 107–112, 2005.

16. XAVIER FE, ARAS-LÓPEZ R, ARROYO-VILLA I, CAMPO LD, SALAICES M, et al. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A₂ and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 154: 1225–1235, 2008.

17. Shi Y, Vanhoutte PM. Oxidative stress and COX cause hyperresponsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 154: 639–651, 2008.

18. HATTORI Y, KAWASAKI H, ABE K, KANNO M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.* 261: H1086–H1094, 1991.

19. XAVIER FE, BLANCO-RIVERO J, AVENDAÑO MS, SASTRE E, YELA R, et al. Aldosterone alters the participation of endothelial factors in noradrenaline vasoconstriction differently in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 654: 280–288, 2011.

20. DOHI Y, KOJIMA M, SATO K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 28: 732–737, 1996.

21. CHUGH SS, WALLNER EI, KANWAR YS. Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. *Semin Nephrol.* 23: 583-592, 2003.
22. LAW CM, SHIELL AW. Is Blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens.* 14: 935-941, 1996.
23. HUXLEY RR, SHIELL AW, LAW CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens.* 18: 815-831, 2000.
24. CANAVAN JP, GOLDSPINK DF. Maternal diabetes in rats. II. Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes.* 37: 1671-1677, 1988.
25. NEHIRI T, DUONG VAN HUYEN JP, VILTARD M, FASSOT C, HEUDES D, FREUND N, DESCHÊNES G, HOUILLIER P, BRUNÉVAL P, LELIÈVRE-PÉGORIER M. Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes.* 7: 2167-2175, 2008.
26. GRILL V, JOHANSSON B, JALKANEN P, ERIKSSON UJ. Influence of severe diabetes mellitus early in pregnancy in the rat: effects on insulin sensitivity and insulin secretion in the offspring. *Diabetologia.* 34: 373-378, 1991.
27. PORTO NP, JUCÁ DM, LAHLOU S, COELHO-DE-SOUZA AN, DUARTE GP, MAGALHÃES PJ. Effects of K⁺ channels inhibitors on the cholinergic

relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 118: 360-363, 2010.

28. CHEN YW, CHENIER I, TRAN S, SCOTCHER M, CHANG SY, ZHANG SL. Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. *Pediatr Nephrol*. 25: 1319-1329, 2010.

29. HOLEMANS K, VAN BREE R, VERHAEGHE J, MEURRENS K, VAN ASSCHE FA. Maternal semistarvation and streptozotocin-diabetes in rats have different effects on the in vivo glucose uptake by peripheral tissues in their female adult offspring. *J Nutr*. Jul: 127: 1371-1376, 1997.

30. BLONDEAU B, JOLY B, PERRET C, PRINCE S, BRUNEVAL P, LELIÈVRE-PÉGORIER M, FASSOT C, DUONG VAN HUYEN JP. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. *Diabetes Metab*. 37: 245-251, 2011.

31. HAN J, XU J, LONG YS, EPSTEIN PN, LIU YQ. Rat maternal diabetes impairs pancreatic beta-cell function in the offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293: E228-E236, 2007.

32. CHAHWALA V, ARORA R. Cardiovascular manifestations of insulin resistance. *Am J Ther*. 16: e14-28, 2009.

33. FÉLÉTOU M, HUANG Y, VANHOUTTE PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch*. 459: 941-950, 2010.

34. RETAILLEAU K, BELIN DE CHANTEMÈLE EJ, CHANOINE S, GUIHOT AL, VESSIÈRES E, TOUTAIN B, FAURE S, BAGI Z, LOUFRANI L, HENRION D.

Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A₂ reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. *Hypertension*. 55: 339-344, 2010.

35. KIMURA I, HATA Y, ISLAM MA, KIMURA M. Diabetes mellitus-induced enhancement of prostaglandin F₂ alpha-responses is inhibited by lipoxygenase- but not cyclooxygenase-inhibitors in mesenteric veins and arteries of mouse and rat. *Jpn J Pharmacol*.64: 65-70,1994.

FIGURE LIST

Table 1. Body weights (BW) and blood glucose (BG) at the times of vascular testing.

Figure 1. Curve endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in rings of thoracic aorta from offspring control rats (CON) and diabetic rats (STZ), with 3 (A), 6 (B) and 12 months-old (C). Results are expressed as mean \pm SEM. N = 6-8 rats in each group.

Figure 2. Endothelium-independent relaxation induced by sodium nitroprusside in mesenteric resistance arteries from (A) 3, (B) 6 and (C) 12 month-old offspring of control (CON) and diabetic (STZ) rats. Each point represents the mean of 7–8 experiments \pm SEM.

Figure 3. Concentration-dependent contraction to phenylephrine in rings of aorta artery from 3- (A), 6 (B) and 12 month-old offspring of diabetic (STZ) and non-diabetic rats (CON). Results (mean \pm S.E.M.) were expressed as a percentage of the initial contraction elicited by KCl. N= 6-7 animals each curve.

Figure 4. Effect of indomethacin (10 mM) or NS-398 (10 mM) on the concentration-dependent relaxation to Ach (A and B) and concentration dependent contraction to Phe (C and D) in segments of aorta artery from 12-month-old CON and STZ. Results are expressed as mean \pm SEM; n = 7–8 animals in each group.

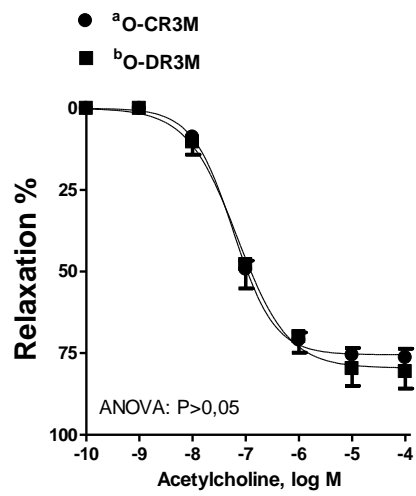
Figure 5. Effect of SQ29548 and furegrelato (A and B) or the combination of SQ29548 + AH6809 + AL8810 (C and D) in endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine and on the concentration-dependent contraction to phenylephrine in aortic rings from offspring diabetic rats with 12 months old (STZ12M). Results are expressed as mean \pm SEM.

Table 1. Body weights (BW) and blood glucose (BG) at the times of vascular testing

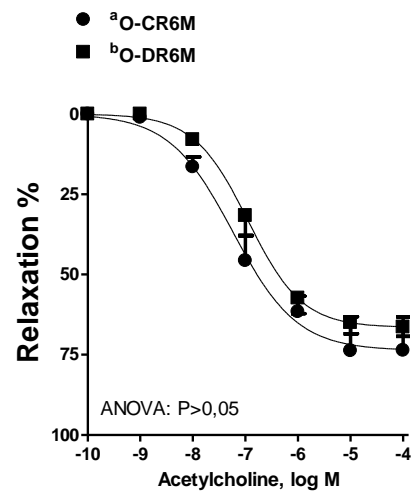
	BW (g)	BG (mg.L⁻¹)	BW (g)	BG (mg.L⁻¹)	BW (g)	BG (mg.L⁻¹)
CON	318 ± 7.23	957 ± 34	422 ± 6.18	952 ± 27	467 ± 0.40	942 ± 41
STZ	295 ± 9.40*	994 ± 13	375 ± 11.7*	925 ± 30	443 ± 2.50	908 ± 21

Values are means ± SEM. ANOVA: *P < 0.05 compared with CON at the same time point. CON, offspring of control rats; STZ, offspring of diabetic rats.

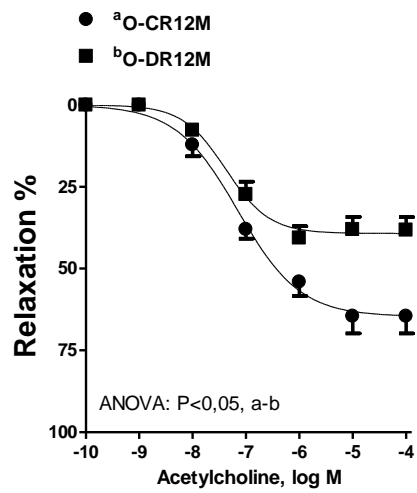
A



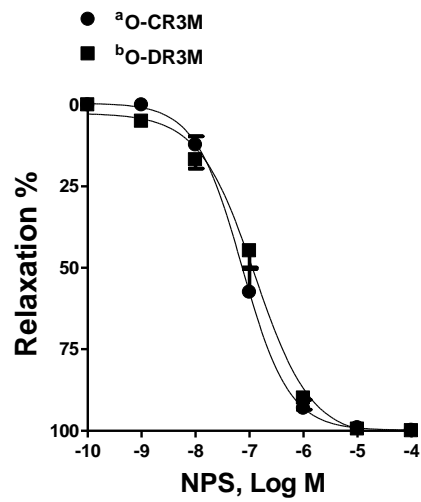
B



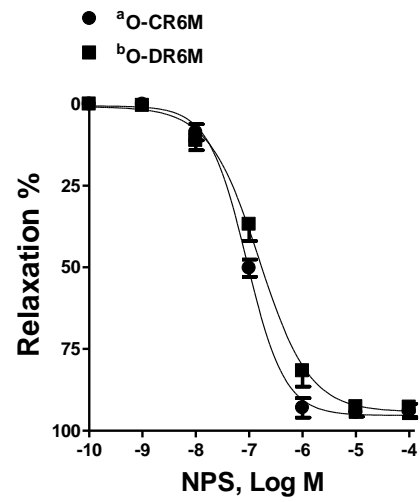
C



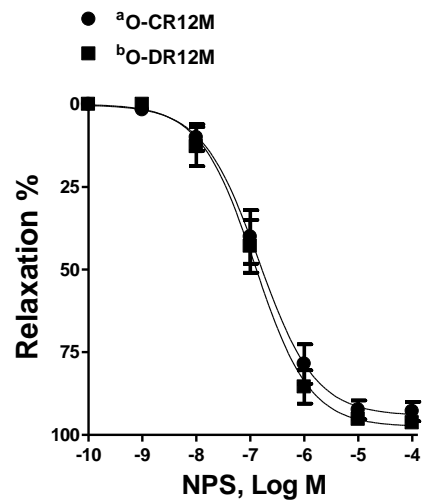
A

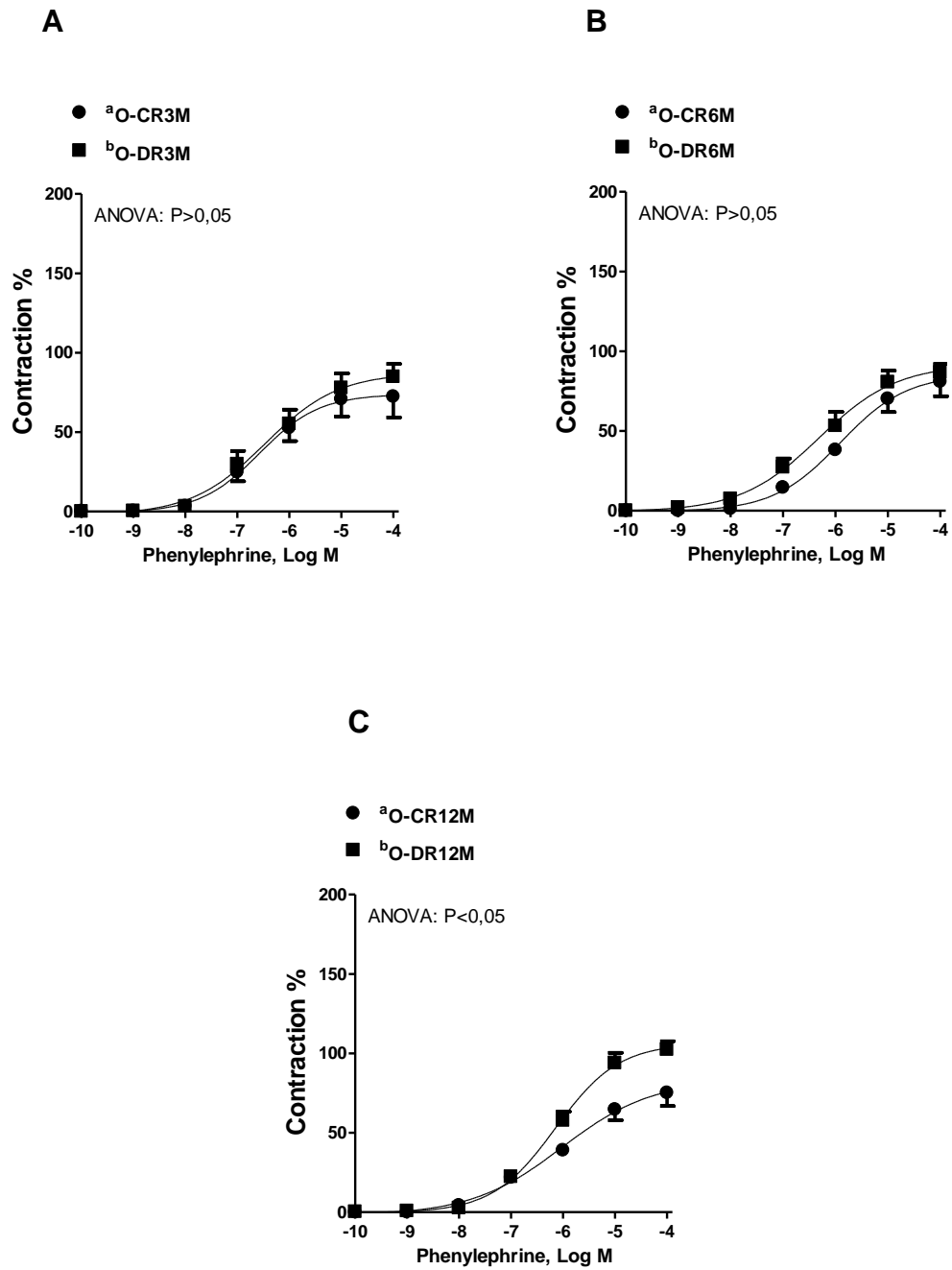


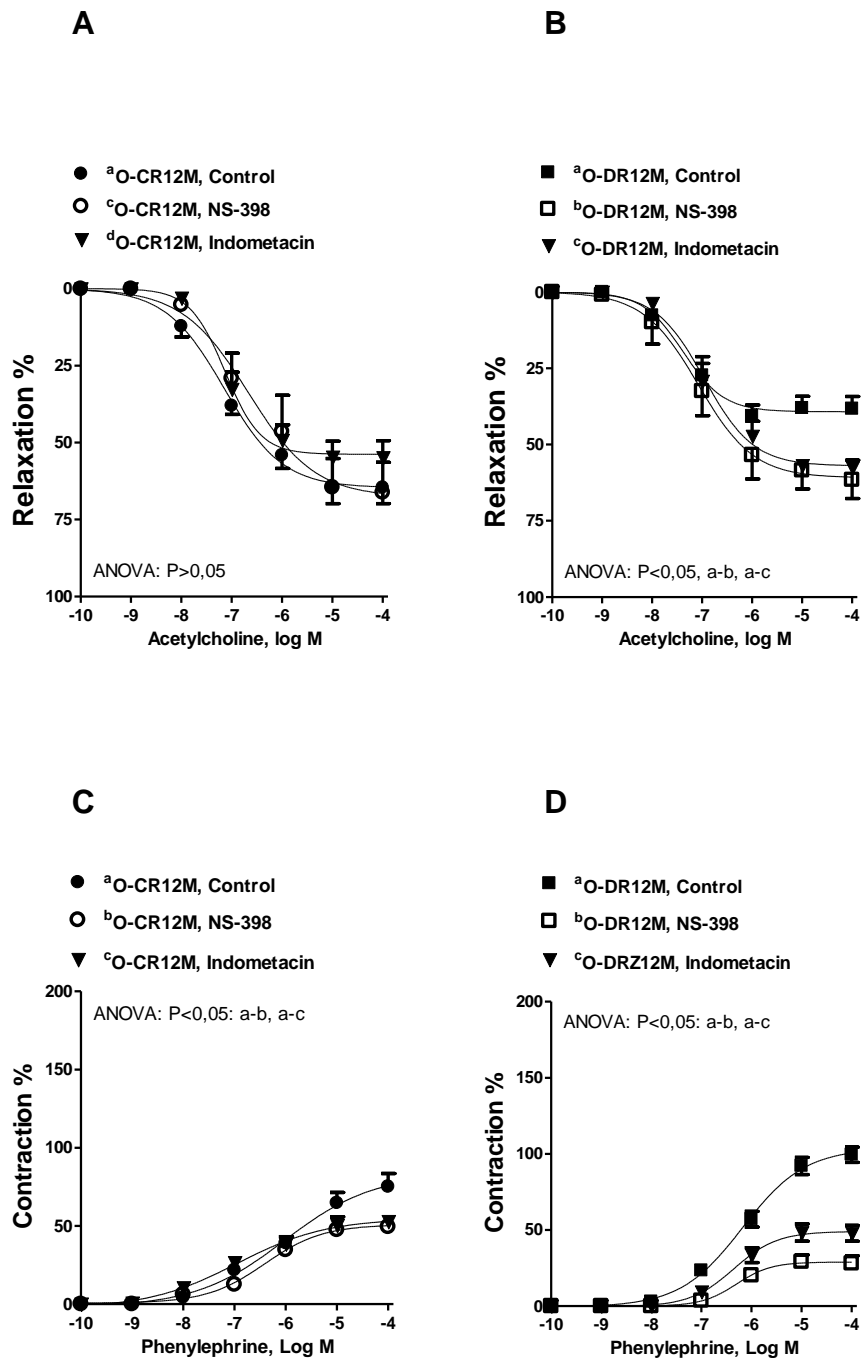
B

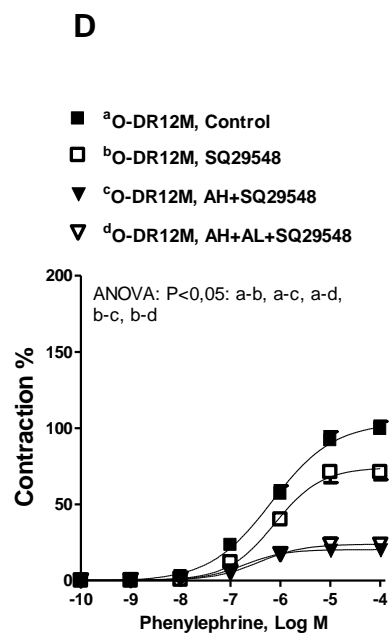
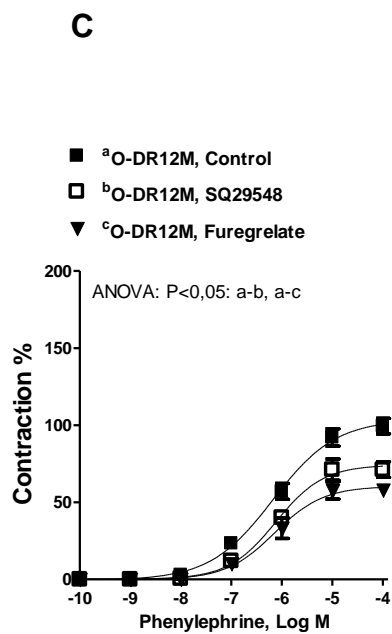
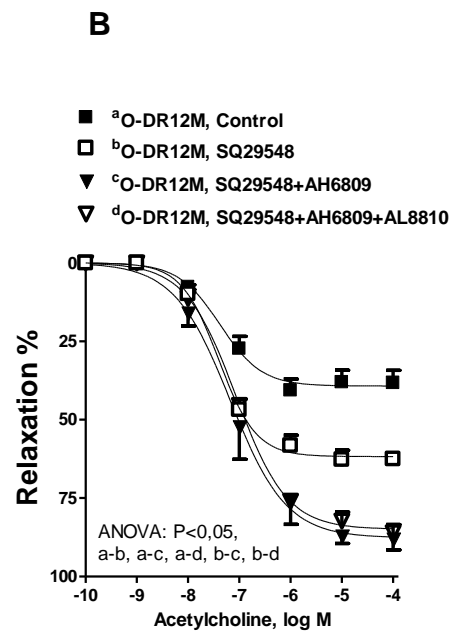
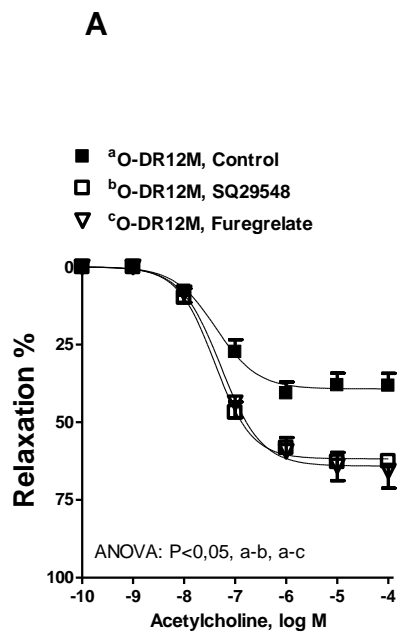


C









3. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que:

- O diabetes melitus gestacional severo proporciona efeitos cardiovasculares e metabólicos deletérios na prole adulta, sendo que estes efeitos são influenciados pelo fator idade;
- Animais adultos provenientes de ratas diabéticas desenvolvem alterações na homeostase da glicose, caracterizadas por intolerância à glicose e resistência à insulina;
- A hiperglicemia materna induziu nos ratos com 6 e 12 meses de idade aumentos significativos na pressão arterial, mas não nos de 3 meses e que esta hipertensão observada nestes animais pode ser atribuída ao aparecimento de disfunção endotelial nos vasos dos mesmos;
- O aumento na síntese ou liberação de fatores contráteis, como derivados do ácido araquidônico através do metabolismo da ciclooxigenase-2 (TxA₂ e PGE₂), parece ser um dos principais mecanismos envolvidos nessas alterações;
- Tais resultados servem de apoio para a investigação dos mecanismos responsáveis sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela hiperglicemia materna, contribuindo para estudos que visem a obtenção de alternativas terapêuticas para essas complicações.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF AA. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med.* **226**: 153-163, 2001.

ABEBE W, HARRIS KH, MACLEOD KM. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J Cardiovasc Pharm.* **16**: 239-248, 1990.

ADEAGBO AS, PATEL D, IDDRISU A, WALKER J, THIRUMALAI S, JOSHUA IG. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 blocker, acutely inhibits receptor-mediated contractions of rat aorta: role of endothelium. *Eur J Pharmacol.* **458**: 145-154, 2003.

AERTS C, VAN ASSHE FA. Rat fetal endocrine pancreas in experimental diabetes. *J Endocrinol.* **73**: 339–346, 1977.

ALVAREZ Y, BRIONES AM, BALFAGON G, ALONSO MJ, SALAICES M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* **23**: 767–777, 2005.

ARIKAWA E, CHEUNG C, SEKIROV I, BATTELL ML, YUEN VG, MCNEILL JH. Effects of endothelin receptor blockade on hyper vasoreactivity in streptozotocin-diabetic rats: vessel-specific involvement of thromboxane A₂. *Can J Physiol Pharm.* **84**: 823-833, 2006.

AUCH-SCHWELKW, KATUSIC ZS, VANHOUTTE PM. Thromboxane A₂ receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* **15**: 699-703, 1990.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **25** suppl 1: 5-20, 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. National Diabetes Fact Sheet. Available at: http://www.diabetes.org/main/info/facts/facts_natl.jsp. Accessed June 16, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* **27** suppl 1: 5-10, 2004.

- AMRI K, FREUND N, VILAR J, MERLET-BENICHO C, LELIEVRE-PEGORIER M. Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes*. **48**: 2240–2245, 1999.
- ASHTON N. Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res*. **33**: 731-740, 2000.
- BARKER DJ AND OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. **1**: 1077-1081, 1986.
- BARKER DJ, OSMOND C, GOLDING J, KUH D, AND WADSWORTH ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. **298**: 564-567, 1989.
- BARKER DJ, WINTER PD, OSMOND C, MARGETTS B, AND SIMMONDS SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. **2**: 577-580, 1989.
- BARKER DJP, GLUCKMAN PD, GODFREY KM, HARDING JE, OWENS JA, ROBINSON JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. **341**: 938-941, 1993.
- BARKER DJP. Mothers, Babies, and Disease in Later Life. *BMJ*, 1994.
- BARKER DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci*. **95**: 115-128, 1998.
- BARKER DJ, BAGBY SP: Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. *J Am Soc Nephrol* .**16**: 2537–2544, 2005.
- BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN JC, MARSHALL PA, FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications of endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*. **87**: 1620-1624, 1990.
- BERK BC, VEKSHEIN V, GORDON HM, TSUDA T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. **4**: 305-314, 1989.
- BOLOKER J, GERTZ SJ, SIMMONS RA. Gestational diabetes leads to their development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* **51**: 1499–1509, 2002.
- BOS CL, RICHEL DJ, RITSEMA T, PEPPELENBOSCH MP, VERSTEEG HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell B*. **36**: 1187-1205, 2004.

BLANCO-RIVERO J, CACHOFEIRO V, LAHERA V, ARAS-LOPEZ R, MARQUEZ-RODAS I, SALAICES M. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. **46**: 107–112, 2005.

BLATOUNI M. Endotélio e Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hipertens*. **8**: 328-338, 2001.

BRIONES AM, MONTOYA N, GIRALDO J, VILA E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol*. **25**: 155-162, 2005.

BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. **318** suppl 20: 1315-1321, 1988.

BUZZARD CJ, PFISTER SL, CAMPBELL WB. Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A₂. *Circ Res*. **72**: 1023-1034, 1993.

CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. **87**: 840-844, 2000.

CARRAPATO MR, MARCELINO F. The infant of the diabetic mother. The critical developmental windows. *Early Pregnancy*. **5**: 57-58, 2001.

CARVALHO MH, FORTES ZB, NIGRO D, OLIVEIRA MA, SCIVOLETTO R. The role of thromboxane A₂ in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one-clip hypertension. *Endothelium* **5**: 167–178, 1997.

CAVANAL MDE F, GOMES GN, FORTI AL, ROCHA SO, FRANCO MDO C, FORTES ZB, GIL FZ The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in the offspring from diabetic mothers. *Pediatr Res*. **62**:145–150, 2007

CHEN G, SUZUKI H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization in arterial smooth muscle cells of the rat. *J Physiol*. **421**: 521-534, 1989.

CHUGH SS, WALLNER EI, KANWAR YS. Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. *Semin Nephrol*. **23**: 583-592, 2003.

COLEMAN RA, SMITH WL, NARUMIYA S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution,

and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* **46**: 205-229, 1994.

COLLINS GJ Jr, RICH NM, ANDERSEN CA, McDONALD PT. Complex cerebral revascularization. *Arch Surg.* **113**: 706-709, 1978.

COSENTINO F, LÜSCHER TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol.* **32 suppl 3**: 54-61, 1998.

CRACOWSKI JL, CAMUS L, DURAND T, DEVILLIER P, GUY A, HARDY G, STANKE-LABESQUE F, ROSSI JC, BESSARD G. Response of rat thoracic aorta to F₂-isoprostane metabolites. *J Cardiovasc Pharmacol.* **39**: 396-403, 2002.

CUSI K, MAEZONO K, OSMAN A. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* **105**: 311-320, 2000.

DABELEA D, HANSON RL, LINDSAY RS, PETTITT DJ, IMPERATORE G, GABIR MM, ROUMAIN J, BENNETT PH, KNOWLER BW. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes.* **49**: 2208-2211, 2000.

DEFRONZO RA, BONADONNA RC, FERRANNINI E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care.* **15**: 318-368, 1992.

DE MEY JG, CLAEVS M, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther.* **222**: 166-173, 1982

DURANTE W, SEN AK, SUNAHARA FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol.* **94**: 463-468, 1988.

EL-ATAT FA, STAS SN, MCFARLANE SI, SOWERS JR. The Relationship between Hyperinsulinemia, Hypertension and Progressive Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* **15**: 2816–2827, 2004.

ELLIS A, PANNIRSELVAM M, TODD JA, TRIGGLE CR. Catalase has negligible inhibitory effects on endothelium-dependent relaxations in mouse isolated aorta and small mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology.* **140**: 1193-1200, 2003.

FELETOU M, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?. *Arterioscl Throm Vas.* **26**: 1215-1225, 2006.

FETITA LS, SOBNGWI E, SERRADAS P, CALVO F, GAUTIER JF. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab.* **91**: 3718-3724, 2006.

FORTES ZB, GARCIA LEME J, SCIVOLETTO R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. *Br J Pharmacol.* **79**: 771-781, 1983.

FOLKOW B. Structural factor in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* **16**: 89-101, 1990.

FRANCO MC, DANTAS AP, AKAMINE EH, KAWAMOTO EM, FORTES ZB, SCAVONE C, TOSTES RC, CARVALHO MH, NIGRO D. Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol.* **40**: 501-509, 2002.

FREINKEL N. Banting Lecture 1980: Of pregnancy and progeny. *Diabetes.* **29**: 1023-1035, 1980.

FURCHGOTT RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol.* **24**: 175-197, 1984.

FUJISAWA Y, NAKAGAWA Y, LI RS, LIU YJ, OHZEKI T. Diabetic pregnancy in rats leads to impaired glucose metabolism in offspring involving tissue-specific dysregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression. *Life Sci.* **81**: 724-731, 2007.

FUNK CD, FURCI L, FITZGERALD GA, GRYGORCZYK R, ROCHETTE C, BAYNE MA, ABRAMOVITZ M, ADAM M, METTERS KM. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP₁ subtype. *J Biol Chem.* **268**: 26767-26772, 1993.

GAO Y, YE LH, KISHI H, OKAGAKI T, SAMIZO K, NAKAMURA A, KOHAMA K. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life.* **51**: 337-344, 2001.

GAO W, QIAO Q, TUOMILEHTO J. Post-challenge hyperglycaemia rather than fasting hyperglycaemia is an independent risk factor of cardiovascular disease events. *Clin Lab.* **50**: 609-615, 2004.

GARAVITO RM, DEWITT DL. The cyclooxygenase isoforms: Structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta.* **1441**: 278-287, 1999.

GARCIA MJ, MCNAMARA PM, GORDON T, KANNEL WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes*. **23**: 105-111, 1974.

GE T, HUGHES H, JUNQUERO DC, WU KK, VANHOUTTE PM, BOULANGER CM. Endothelium dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res*. **76**: 1003-1010, 1995.

GLUAIS P, LONCHAMPT M, MORROW JD, VANHOUTTE PM, FÉLÉTOU M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol*. **146**: 834-845, 2005.

GLUAIS P, PAYSANT J, BADIÉ-COMMANDER C, VERBEUREN T, VANHOUTTE PM, FÉLÉTOU M. In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A₂ as endothelium-derived contracting factors. *Am J Physio-Heart C*. **291**: 2255-2264, 2006.

GRASSI G, DELL'ORO R, QUARTI-TREVANO F. Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia*. **48**:1359–65, 2005.

GRILL V, JOHANSSON B, JALKANEN P, ERIKSSON UJ. Influence of severe diabetes mellitus early in pregnancy in the rat: effects on insulin sensitivity and insulin secretion in the offspring. *Diabetologia*. **34**: 373-378, 1991.

GRISWOLD DE & ADAMS JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Medic Res Rev*. **16**: 181-206, 1996.

GUZIK TJ, MUSSA S, GASTALDI D, SADOWSKI J, RATNATUNGA C, PILLAI R . Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**: 1656–1662, 2002.

HAFFNER SM, STERN MP, HAZUDA HP, MITCHELL BD, PATTERSON JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?. *JAMA*. **263**: 2893-2898, 1990.

Haidara MA, Yassin HZ, RATEB M, AMMAR H, ZORKANI MA. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. **4**: 215-227, 2006.

HARRIS M, ZIMMET P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 2: 9-23, 1997.

HASDAI D, GIBBONS RJ, HOLMES DR Jr, HIGANO ST, LERMAN A. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. *Circulation*. **96**: 3390-3395, 1997.

HATHAWAY DR, EATON CR, ADELSTEIN RS. Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature*. **291**: 252-256, 1981.

HENRION D, DECHAUX E, DOWELL FJ, MACLOUR J, SAMUEL JL, LEVY BI, MICHEL JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2. *Br J Pharmacol*. **121**: 83-90, 1997.

HENRY RR, GUMBINER B, DITZLER T et al. Intensive conventional insulin therapy for type II diabetes. Metabolic effects during a 6-month outpatient trial. *Diabetes Care*. **16**: 21-31, 1993.

HEYGATE KM, LAWRENCE IG, BENNETT MA, THURSTON H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol*. **116**: 3251-3259, 1995.

HEYMES C, HABIB A, YANG D, MATHIEU E, MAROTTE F, SAMUEL J, BOULANGER C M. Cyclo-oxygenase 1 e 2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *British Journal Pharmacology*. **131**: 804-810, 2003.

HOLEMANS K, AERTS L, VAN ASSCHE FA. Evidence for an insulin resistance in adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **34**: 3481-3485, 1991.

HOLEMANS K, GERBER RT, MEURRENS K, DE CLERCK F, POSTON L, VAN ASSCHE FA. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia*. **42**: 81-89, 1999.

HOROWITZ A, MENICE C B, LAPORTE R, MORGAN KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. **76**: 967-1003, 1996.

HSUEH WA, ANDERSON PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension*. **20**: 253-263, 1992.

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

INOUE A, YANAGISAWA M, KIMURA S, KASUYA Y, MIYAUCHI T, GOTO K, MASAKI T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci.* **86**: 2863-2867, 1989.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas third Edition Executive Summary. International Diabetes Federation. 2007.

IMAOKA, Y., OSANAI, T., KAMADA, T., MIO, Y., SATOH, K. & OKUMARA, K. Nitric oxide-dependent vasodilator mechanism is not impaired by hypertension but is diminished with ageing in the rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **33**: 756 -761, 1999.

KANNEL WB. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study: 18-year follow-up. *Cardiol Dig.* 11-15, 1976.

KATUSIC ZS, VANHOUTTE PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol.* **257**: 33-37, 1989.

KERVAN A, GUILLAUME M, JOST A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia.* **15**: 387–393, 1978.

KLAHR S, MORRISSEY J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* **41**: S3-7, 2003.

KLEIN BE, KLEIN R, MOSS SE. Blood pressure in a population of diabetic persons diagnosed after 30 years of age. *Am J Public Health.* **74**: 336-339, 1984.

KRIEGER EM, SANTOS RAS. Angiotensinas. Aspectos fisiológicos. *Hipertensão.* **1**: 7-10, 1998.

KORNER PI, ANGUS JA. Vascular remodeling. *Hypertension.* **29**: 1965-1966, 1997.

KUNSCH C, MEDFORD RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* **85**: 753-766, 1999.

LANGENSTROER P, PIEPER GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol.* **263**: 257-265, 1992.

LANDGRAF W, RUTH P, KEILBACH A, MAY B, WELLING A, HOFMANN F. Cyclic GMP-dependent protein kinase and smooth muscle relaxation. *J Cardiovasc Pharm.* **20**: 18-22, 1992.

LAW CM AND SHIELL AW. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens.* **14**: 935-941, 1996.

LAW CM. Significance of birth weight for the future. *Arch Dis Child Fetal.* **86**: 7-8, 2002.

LI YJ, ZHUN H, STRANSBURY KH, TRUSH MA. Oxygen Radicals and Disease process, pp. 327-377. Amsterdam: Harwood Academic. 1997.

LINDSAY RM, PEET RS, WILKIE GS, ROSSITER SP, SMITH W, BAIRD JD, WILLIAMS BC. In vivo and in vitro evidence of altered nitric oxide metabolism in the spontaneously diabetic, insulin-dependent BB/Edinburgh rat. *Br J Pharmacol.* **120**: 1-6, 1997.

LIU S, MA X, GONG M, SHI L, LINCOLN T, WANG S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **42**: 852–863, 2007.

LUCAS SR, COSTASILVA VL, MIRAGLIA SM, ZALADEK GIL F. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. *Pediatr Nephrol.* **11**: 719-723, 1997.

ŁUCZAK K, BALCERCZYK A, SOSZYŃSKI M, BARTOSZ G. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. *Cell Biol Int.* **28**:483-6, 2004

LYNCH SA, WRIGHT C. Sirenomelia, limb reduction defects, cardiovascular malformation, renal agenesis in an infant born to a diabetic mother. *Clin Dysmorphol.* **6**: 75-80, 1997.

MAAREK B, SIMON A, LEVENSON CJ, PETHOSIS-MERLE I, BONTHIER J. Heterogeneity of subclinical damage of large arteries in treated systemic hypertension. *Am J Cardiol.* **9**: 414-417, 1987.

MAGATON A, GIL FZ, CASARINI DE, CAVANAL MD, GOMES GN. Maternal diabetes mellitus: early consequences for the offspring. *Pediatr Nephrol.* **22**: 37-43, 2007.

MALEE MP, WU KY. Adrenocortical imprint in the fetus of a diabetic gestation. *Biology of the Neonate.* **76**: 44–54, 1999.

MANDERSON JG, MULLAN B, PATTERSON CC, HADDEN DR, TRAUB AI, MCCANCE DR. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia.* **45**: 991-996, 2002.

- MARÍN J, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* **75**: 111-134, 1997.
- MANRIQUE C, LASTRA G, GARDNER M, SOWERS JR. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Hypertension: Roles of Insulin Resistance and Oxidative Stress. *Med Clin North Am.* **93**: 569–582, 2009.
- MARITIM AC, SANDERS RA, WATKINS JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* **17**: 24-38, 2003.
- MARRERA MB, FULTON D, STEPP D, STERN DM. Angiotensin II-induced signaling pathways in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* **2**: 197-202, 2005.
- MATOBA, T., SHIMOKAWA, H., NAKASHIMA, M., HIRAKAWA, Y., MUKAI, Y., HIRANO, K., KANAIDE, H. & TAKESHITA, A. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* **106**: 1521 – 1530.
- MATSUMOTO T, KAKAMI M, NOGUCHI E, KOBAYASHI T, KAMATA K. Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **293**: 1480-1490, 2007.
- MAYEUX PR, MAIS DE, CARR C, HALUSHKA PV. Human erythroleukemia cells express functional thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **250**: 923-927, 1989.
- MAZZONE T, CHAIT A, PLUTZKY J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet.* **371**: 1800-1809, 2008.
- MERVAALA EM, CHENG ZJ, TIKKANEN I, LAPATTO R, NURMINEN K, VAPAATALO H, MÜLLER DN, FIEBELER A, GANTEN U, GANTEN D, LUFT FC. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension.* **37**: 414-418, 2001.
- MILLER VM & VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol.* **248**: 432-437, 1985.
- MILLS JL. Malformations in infant of diabetic mothers. *Teratology.* **25**: 385-394, 1982.
- MORIKAWA K, MATOBA T, KUBOTA H, HATANAKA M, FUJIKI T, TAKAHASHI S, TAKESHITA A, SHIMOKAWA H. Influence of diabetes

mellitus, hypercholesterolemia, and their combination on EDHF-mediated responses in mice. *J Cardiovasc Pharm.* **45**: 485-490, 2005.

MORRISH NJ, WANG SL, STEVENS LK et al. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia.* **44** suppl 2: 14-21, 2001.

MÜNDEL T, JUST H, HARRISON DG: The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz.* **22**: 158-172, 1997.

MULVANY MJ. Relations between vascular structure and blood pressure. *J Clin Hypertens.* **3**: 313-316, 1987.

NEHIRI T, DUONG VAN HUYEN JP, VILTARD M, FASSOT C, HEUDES D, FREUND N, DESCHÊNES G, HOUILLIER P, BRUNÉVAL P, LELIÈVRE-PÉGORIER M. Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes.* **7**: 2167-2175, 2008.

NEEDLEMAN P, TURK J, JAKSCHIK BA, MORRISON AR, LEFKOWITH JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem.* **55**: 69-102, 1986.

NOLD JL, GEORGIEFF MK. Infants of diabetic mothers. *Pediatr Clin N Am.* **51**: 619-637, 2004.

O'NEILL GP, MANCINI JA, KARGMAN S, YERGEY J, KWAN MY, FALGUEYRET JP, ABRAMOVITZ M, KENNEDY BP, OUELLET M, CROMLISH W. Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol Pharmacol.* **45**: 245-254, 1994.

OLIVEIRA SF, DA LUZ PL, RAMIRES JAF. Disfunção vascular no diabetes melito. *Ver Soc Cardiol.* n °5, 1998.

OYAMA Y, KAWASAKI H, HATTORI Y, KANNO M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* **132**: 75-78, 1986.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* **333**: 664-666, 1988.

PARENTE E, PERRETTI M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Bioch Pharmacol.* **65**: 153-159, 2003.

PATOCKA J, MERKA V, HRDINA V, HRDINA R. Pharmacological potential of endothelin receptors agonists and antagonists. *Kralove Acta Medica (Hradec)*. **48**: 67-73, 2005.

PEDERSEN LM, TYGSTRUP I, PEDERSEN J. Congenital malformations in newborn infants of diabetic women. Correlation with maternal diabetic vascular complications. *Lancet*. **13**: 1124-1126, 1964.

PELL S, D'ALONZO CA. Some aspects of hypertension in diabetes mellitus. *JAMA*. **202**: 104-110, 1967.

PETRIE JR, UEDA S, WEBB DJ, ELLIOTT HL, CONNELL JM. Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation*. **93**: 1331-1333, 1996.

PLAGEMANN A, HARDER T, KOHLHOFF R, ROHDE W, DORNER G. Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia*. **40**: 1094-1100, 1997.

PIERCE KL, FUJINO H, SRINIVASAN D, REGAN JW. Activation of FP prostanoid receptor isoforms leads to Rho-mediated changes in cell morphology and in the cell cytoskeleton. *J Biol Chem*. **274**: 35944-35949, 1999.

PIEPER GM, MOORE-HILTON G, ROZA AM. Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic BB rat. *Life Sci*. **58**: 147-152, 1996.

PIEPER GM, SIEBENEICH W, DONDLINGER LA. Short-term oral administration of L-arginine reverses defective endothelium-dependent relaxation and cGMP generation in diabetes. *Eur J Pharmacol*. **317**: 317-320, 1996.

PIEPER GM, DONDLINGER LA. Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: acute arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production. *J Pharmacol Exp Ther*. **283**: 684-691, 1997.

PIEPER GM. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia*. **42**: 204-213, 1999.

PITKIN RM, VAN ORDEN DE. Fetal effects of maternal streptozotocin diabetes. *Endocrinology*. **94**: 1247-1253, 1974.

POLLMAN MJ, YAMADA T, HORIUCHI M, GIBBONS GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res.* **79**: 748-756, 1996.

PRICHARD BN, SMITH CC, SEN S, BETTERIDGE DJ. Hypertension and insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol.* **11**:77-84, 1992.

RAPOPORT RM, DRAZNIN MB, MURAD F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature.* **306**: 174-176, 1983.

REISIN E, JACK AV. Obesity and hypertension: mechanisms, cardio-renal consequences, and therapeutic approaches. *Med clin north am.* **93**: 733-751, 2009.

RITCHIE SA, CONNELL JMC. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nut, Met & Card Dis.* **17**: 319-326, 2007.

RITZ E, STRUMPF C, KATZ F, WING AJ, QUILLHORTS E. Hypertension and cardiovascular risk factors in hemodialyzed diabetic patients. *Hypertension.* **7** suppl 2: 118-124, 1985.

RIZVI MA, MYERS PR. Nitric oxide modulates basal and endothelin-1-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. *J Mol Cell Cardiol.* **29**: 1779-1789, 1997.

ROBERTS AB, PATTISON NS. Pregnancy in women with diabetes mellitus, twenty years experience 1968-1987. *N Z Med J.* **103**: 211-213, 1990.

ROBERTSON BE, SCHUBERT R, HESCHELER J, NELSON MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* **265**: 299-303, 1993.

ROBINSON, J., CANAVAN, J.P., HAJ, A.J.E., GOLDSPINK, D.F. Maternal diabetes in rats I. Effects on placental growth and protein turnover. *Diabetes.* **37**: 1665-1670, 1988.

ROCCO L, GIL FZ, DA FONSECA PLETISKAITZ TM, DE FÁTIMA CAVANAL M, GOMES GN. Effect of sodium overload on renal function of offspring from diabetic mothers. *Pediatr Nephrol.* **23**: 2053-60, 2008.

ROCHA SO, GOMES GN, FORTI AL, DO CARMO PINHO FRANCO M, FORTES ZB, DE FÁTIMA CAVANAL M, GIL FZ. Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in the rat male offspring. *Pediatr Res.* **58**: 1274-1279, 2005.

ROSS MG, DESAI M, KHORRAM O, MCKNIGHT RA, LANE RH, TORDAY J. Gestational programming of offspring obesity: a potential contributor to Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res.* **4**: 213-217, 2007.

ROSSONI LV, SALAICES M, MIGUEL M, BRIONES AM, BARKER LA, VASSALLO DV, ALONSO MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol.* **283**: 2110-2118, 2002.

RUBANYI GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J Cardiovasc Pharm.* **22** suppl 4: 1-14, 1993.

RUTKAI I, FEHER A, ERDEI N, HENRION D, PAPP Z, EDES I, KOLLER A, KALEY G, BAGI Z. Activation of prostaglandin E2 EP1 receptor increases arteriolar tone and blood pressure in mice with type 2 diabetes. *Card Resc.* **83**: 148–154, 2009.

SALVEMINI D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cel and Mol Life Sciences.* **53**: 576-582, 1997.

SANTHANAM L, LIM HK, LIM HK, MIRIEL V, BROWN T, PATEL M, BALANSON S, RYOO S, ANDERSON M, IRANI K, KHANDAY F, DI COSTANZO L, NYHAN D, HARE JM, CHRISTIANSON DW, RIVERS R, SHOUKAS A, BERKOWITZ DE. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res.* **101**: 692-702, 2007.

SCHONFELD G: Diabetes, lipoproteins, and atherosclerosis. *Metabolism.* **34**: 45-50, 1985.

SEGAR EM, NORRIS AW, YAO JR, HU S, KOPPENHAFFER SL, ROGHAIR RD, SEGAR JL, SCHOLZ TD. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. *Clin Sci.***117**: 129-138, 2009.

SCHIFFRIN EL, LEMARIÉ C. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J RENIN Angiotensin Aldosterone Syst.* **11**: 19-31, 2009.

SHI Y, FELETOU M, KU DD, MAN RYK, VANHOUTTE PM. The calcium ionophore A23187 induces endothelium-dependent contractions in femoral arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol.* **150**: 624-632, 2007.

SHI Y, VANHOUTTE PM. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol*. **154**: 639-651, 2008.

SHIMIZU K, MURAMATSU M, KAKEGAWA Y, ASANO H, TOKI Y, MIYAZAKI Y, OKUMURA K, HASHIMOTO H, ITO T. Role of prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes*. **42**: 1246-1252, 1993.

SIEGEL G. Vascular Smooth Muscle. *Comprehensive Human Physiology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. **2**:1955, 1996.

SILVERMAN BL, RIZZO T, GREEN OC, CHO NH, WINTER RJ, OGATA ES, RICHARDS GE, METZGER BE. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes*. **40** suppl 2: 121-125, 1991.

SIMON AR, RAI U, FANBURG BL, COCHRAN BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol*. **275**: 1640-1652, 1998.

SMITH L, PAYNE JA, SEDEEK MH, GRANGER JP, KHALIL RA. Endothelin-induced increases in Ca⁺² entry mechanisms of vascular contraction are enhanced during high-salt diet. *Hypertension*. **41**: 787-793, 2003.

SOWERS JR. Relationship between hypertension and subtle and overt abnormalities of carbohydrate metabolism. *J Am Soc Nephrol*. **1**: 39-47, 1990.

SOWERS JR AND EPSTEIN M. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease and nephropathy. *Hypertension*. **26**: 869-879, 1995.

SOWERS JR, EPSTEIN M, FROHLICH ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*. **37**: 1053-1059, 2001.

STRATTON IM, ADLER AJ, NEIL HA, MATTHEWS DR, MANLEY SE, CULL CA, HADDEN D, TURNER RC, HOLMAN RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. **321**: 405-412, 2000.

RHODIN, J.A.G. Architecture of the vessel wall. *The Cardiovascular System, American Physiological Society*. **2**: 1-31, 1980.

TADDEI S, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A₂. *J Cardiovasc Pharm*. **22** suppl 8: 328-331, 1993.

TADDEI S, VIRDIS A, MATTEI P, GHIADONI L, FASOLO CB, SUDANO I, SALVETTI A. Hypertension causes premature ageing of endothelial function in humans. *Hypertension*. **29**: 736 – 743, 1997.

TAKAMURAS, SHIMOKAWA H, ZHAO H, IGARASHI H, EGASHIRA K, TAKESHITA A. Important Role of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Shear Stress-Induced Endothelium-Dependent Relaxations in the Rat Mesenteric Artery. *J Cardiovasc Pharm*. **34**: 381-387, 1999.

THAMOTHARAN M, MCKNIGHT RA, THAMOTHARAN S, KAO DJ, DEVASKAR SU. Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. *Am J Physiol-endoc m* **284**: 901–914, 2003.

TANG EH, KU BBDD, TIPOE GL, FELETOU M, MAN RY, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent contractions occur in the aorta of wild-type and COX2-/- knockout but not COX1-/- knockout mice. *J Cardiovasc Pharm*. **46**: 761-765, 2005.

TIRAPELLI CR, CASOLARI DA, YOGI A, MONTEZANO AC, TOSTES RC, LEGROS E, D'ORLÉANS-JUSTE P, DE OLIVEIRA AM: Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K channels in ET-induced relaxation. *Br J Pharmacol*. **146**: 903-912, 2005.

TESFAMARIAM B, JAKUBOWSKI JA, COHEN RA. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. *Am J Physiol*. **257**: 1327-1333, 1989.

TESFAMARIAM B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radical Bio Med*. **16**: 383-391, 1994.

TEUSCHER A, EGGER M, HERMAN JB. Diabetes and hypertension: Blood pressure in clinical diabetic patients and a control population. *Arch Intern Med*. **149**: 1942-1945, 1989.

TOUYZ RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. **2**:98-105, 2000.

TOUYZ RM, BERRY C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. **35**: 1001-1015, 2002.

VAGNONI KE, CHRISTIANSEN ND, HOLYOAK GR, JANOWIAK MA, MARTIN PH. Cellular source in ewes of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in

uterine arteries following stimulation with lipopolysaccharide. *Biol Reprod.* **61**: 563–568, 1999.

VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens.* **14**: 83-93, 1996.

VANHOUTTE PM, FÉLÉTOU M, TADDEI S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* **144**: 449-458, 2005.

VIRDIS A, GHIADONI L, TADDEI S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Eur J Physiol.* **459**: 1015-1023, 2010.

VLASSARA H, BROWNLEE M, MANAQUE K, PASAGIAN A, CERAMI A. Cachectin/TNF and IL-2 synthesis and secretion are induced by glucose-modified protein binding to a high affinity macrophage receptor. *Science.* **240** suppl 4858: 1546-1548, 1988.

XAVIER FE, DAVEL AP, ROSSONI LV, VASSALLO DV. Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vasc Pharmacol.* **40**: 67-76, 2003.

XAVIER FE, ROSSONI LV, ALONSO MJ, BALFAGÓN G, VASSALLO DV, SALAICES M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in α -adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* **143**: 215-225, 2004.

YAMAGATA K, MATSUMURA K, INOUE W, SHIRAKI T, SUZUKI K, YASUDA S, et al. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci.* **21**: 2669-2677, 2001.

YANG D, FELETOU M, LEVENS N, ZHANG JN, VANHOUTTE PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension.* **41**: 143-148, 2003.

YURA T, FUKUNGAGA M, KHAN R, NASSAR GN, BADR KF, MONTERO A. Free-radical-generated F₂-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.* **56**: 471-478, 1999.

WADSWORTH ME, CRIPPS HA, MIDWINTER RE, COLLEY JR. Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass. *Br Med J* **291**: 1534-1538, 1985.

WASSMANN S, WASSMAN K, NICKENIG G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* **44**: 381-386, 2004.

WEISS PAM, TAMUSSINO KF, SCHOLZ HS, SEISSLER J, HAAS J, BORKENSTEIN M. Long-term follow-up of infants of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. **23**: 905-911, 2000.

WICHI RB, SOUZA SB, CASARINI DE, MORRIS M, BARRETO-CHAVES ML, IRIGOYEN MC. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. *Am J Physiol-Reg I*. **288**: 1129-1133, 2005.

WOLIN MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Throm Vas*. **20**: 1430-1442, 2000.

WONG SL, LEUNG FP, LAU CW, AU CL, YUNG LM, YAO X, CHEN ZY, VANHOUTTE PM, GOLLASCH M, HUANG Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F_{2α} mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res*. **104**: 228-235, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention of diabetes mellitus. Technical Report Series no. 844. Geneva: *World Health Organization*, 1994.

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K, MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. **332**: 411-415, 1988.

YANG D, FÉLÉTOU M, BOULANGER CM, WU HF, LEVENS N, ZHANG JN, VANHOUTTE PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. **136**: 104-110, 2002.

YURA T, FUKUNAGA M, KHAN R, NASSAR GN, BADR KF, MONTERO A. Free-radical-generated F₂-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int*. **56**: 471-478, 1999.

ZAFARI AM, USHIO-FUKAI M, AKERS M, et al. Role of NADH/NADPH oxidase driven H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. **32**: 488-495, 1998.

ZANDI-NEJAD K, LUYCKX VA, BRENNER BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension*. **47**: 502-508, 2006.

ZHANG MZ, WANG JL, CHENG HF, HARRIS RC, MCKANNA JA. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol*. **273**: 994-1002, 1997.

ZIMMERMANN KC, SARBIA M, SCHRÖR K, WEBER AA. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol*. **54**: 536-540, 1998.