

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DIABETES GESTACIONAL: RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E A
EXPRESSÃO DO FATOR NUCLEAR KAPPA B**

Geórgia Maria Ricardo Félix dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

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

Recife/2013

GEÓRGIA MARIA RICARDO FÉLIX DOS SANTOS

**DIABETES GESTACIONAL: RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E A
EXPRESSÃO DO FATOR NUCLEAR KAPPA B**

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

Recife/2013

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

Santos, Geórgia Maria Ricardo Félix dos

Diabetes gestacional: relação entre estresse oxidativo e a expressão do fator nuclear Kappa B / Geórgia Maria Ricardo Félix dos Santos. – Recife: O Autor, 2015.

89 f.

Orientadores: Glória Isolina Boente Pinto Duarte, Cristina de Oliveira Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Diabetes 2. Glândulas endócrinas - Doenças 3. Diabetes na gravidez I. Duarte, Glória Isolina Boente Pinto (orient.) II. Silva, Cristina de Oliveira (coorient.) III. Título.

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-242

DIABETES GESTACIONAL: RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E A EXPRESSÃO DO FATOR NUCLEAR KAPPA B

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

Aprovado por:

Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Silva

Prof. Dra. Dayane Aparecida Gomes

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Data: 15/08/2013

Dedico esta tese a minha mãe Goreti, exemplo de fé e perseverança, e por ter compartilhado dos desafios e alegrias que envolveram este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha família e a André Ribas pelo amor, carinho, por apoiarem meus sonhos e respeitarem minhas escolhas.

Às minhas orientadoras Professoras Cristina de Oliveira e Glória Isolina Boente Pinto Duarte, pela confiança, pelo apoio na realização deste documento e por abrirem as portas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LFFCV) para que este trabalho fosse realizado.

A professora Maria Luiza Barreto de Chaves pela oportunidade de realizar alguns experimentos no Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional da Universidade de São Paulo (USP).

A todos que fazem o LFFCV e o Laboratório de Reatividade Vascular (LRV): Diego de Queiroz, Diego Rafael, Fernanda Elizabete, Francine Iane, Geórgia Leal, Gyl Everson, Hicla Stefany, Jean Pereira, José Jairo, Juliana Dantas, Juliana Rocha, Mayra Pereira, Marcelo Rocha e Thayane Rebeca.

A técnica Dijanah Cota pelo carinho e amizade.

Ao técnico José Antônio e a veterinária Cláudia Oliveira pela dedicação no cuidado com os animais.

Ao secretário Djalma do Programa de Pós-graduação, pelo auxílio nas questões administrativas.

Pelo apoio financeiro: CNPq, FACEPE, CAPES.

A todos, que não foram citados, mas que contribuíram para a execução desse projeto.

Obrigada!

De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encont

Fernando Sabino

RESUMO

Elevados níveis de hiperglicemia durante a gestação pode ter consequências deletérias para prole que inclui doenças cardiovasculares (DCV) e renais. As complicações cardiovasculares do diabetes resultam de um conjunto de fatores que envolvem a hiperglicemia crônica, a formação excessiva dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e de oxidação proteica (AOPP) e a ativação do fator de transcrição nuclear kappaB (NF-κB), associada à liberação de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, é de grande relevância a elucidação de mecanismos envolvidos na gênese e/ou manutenção do processo oxidativo que pode ser perpetuada na prole exposta à hiperglicemia. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição intra-uterina a hiperglicemia (> 200 mg/dL) sobre AGEs, AOPP, bem como a expressão proteica do NF-κB, a expressão gênica da interleucina-1 beta (IL-1β) e Nox 4 (homólogo da subunidade da NADPH oxidase) na prole adulta. Para isto, o DG foi induzido no sétimo dia de gestação com dose única de estreptozotocina (STZ, 42mg/kg, i.p.) dissolvida em tampão citrato (veículo). Fêmeas controles receberam apenas veículo. A prole foi dividida em dois grupos de acordo com o tratamento da mãe: controle não diabético (ND) e diabetes gestacional (DG). Na idade adulta, foram realizadas as dosagens de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL. A concentração plasmática de AGEs foi determinada por fluorescência e a de AOPP por espectrofotometria, os níveis de peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A expressão proteica do NF-κB foi analisada em aortas através de Western Blot. Foi utilizada reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RTq-PCR) para avaliar a expressão gênica da IL-1β e Nox 4. Os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total foram significativamente ($p < 0,05$) maiores na prole DG quando comparadas a prole ND. A prole DG apresentaram níveis elevados de AGEs ($p < 0,01$), AOPP ($p < 0,05$) e TBARS ($p < 0,05$). Em aorta, a expressão proteica do NF-κB foi mais elevada ($p < 0,05$) no grupo DG do que no ND. Adicionalmente, foi observado um aumento da expressão gênica da IL-1β e da Nox4. O número de néfrons desses animais foi significativamente reduzido ($p < 0,001$). A associação de níveis elevados de estresse oxidativo e interleucina-1 beta podem ser responsáveis pela estimulação da expressão proteica do NF-κB. Juntas, essas alterações em um ambiente hiperglicêmico, com indícios de comprometimento renal, poderiam desencadear alterações vasculares.

Palavras-chave: Diabetes. Estreptozotocina. NADPH oxidase.

ABSTRACT

Experimental evidences support the hypothesis that diseases can be programmed during the period intrauterine. This concept of programming fetal has been used as basis for knowledge of some chronic diseases, such the cardiovascular. Cardiovascular disease has been associated with hyperglycemia, increased level of advanced glycation end products (AGE) and of advanced oxidation products (AOPP) activate the transcription factor nuclear factor-kappaB (NF- κ B) associated with inflammatory cytokine liberation. Therefore, the present study was designed to examine the alterations produced by maternal diabetes over the AGEs, AOPP, NF- κ B protein expression, and mRNA expressions of IL-1 β and Nox4 in adult offspring rats. Maternal diabetes was induced in female Wistar rats with a single dose of streptozotocin (STZ; 42 mg/kg, i.p.) on the 7th day of pregnancy. Control animals only received STZ vehicle. The offspring were divided into two groups: control non-diabetic (ND) and gestational diabetes (DG). Plasma levels of glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were analyzed through biochemical measurements. Plasma levels of AGEs and AOPPs were detected using spectrofluorimetry and spectrophotometry, respectively. Lipid peroxidation was assessed in liver tissue by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The NF- κ B protein expression was evaluated by Western blot. The mRNA levels of IL-1 β and Nox4 were detected quantitatively by real time polymerase chain reaction (real-time PCR). In the DG offspring, it was observed that plasma levels of glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were higher when compared to the control group. AGEs, AOPP and TBARS concentration were significantly higher in animals exposed to the DG compared with ND. The NF- κ B protein expression was higher ($p < 0,05$) in aorta from DG than in ND. In addition, the expression of IL-1 β and Nox4 mRNA was elevated. The number of nephron in DG was significantly reduced ($p < 0,001$). These results also support the involvement of oxidative stress species in IL-1 β induced NF- κ B expression. Together, these data suggest that hyperglycemia is a risk factor for vascular alterations.

Keywords: Diabetes. Streptozotocin. NADPH-oxidase.

AGEs: Produtos Finais da Glicação Avançada

AOPP: Produtos Avançados de Oxidação Proteica

BB: *Bio Breeding*

DCV: Doenças Cardiovasculares

COX-2: Ciclooxygenase 2

CT: Colesterol Total

DG: Diabetes Gestacional

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

GK: *Goto Kakizaki*

e.v.: Endovenosa

GSH-Px: Glutathione Peroxidase

HDL: Lipoproteínas de alta densidade

hPGH: Hormônio de Crescimento Placentário Humano

hPL: Hormônio Lactogênico Placentário Humano

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HO₂: hidroperoxila

IKK: Quinase kappa B

IκB: Proteína inibitória da família kappa B

NIK: Quinase indutora de NF-κB

IL: Interleucina

i.p.: Intraperitoneal

LDL: Lipoproteínas de baixa densidade

LPS: Lipopolissacarídeos

MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH oxidase: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato oxidase

NF-κB: Fator Nuclear-kappa B

NLS: Sinal de Localização Nuclear

NO: Óxido nítrico

NOD: *Non Obese Diabetic*

OLETF: *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty*

O₂•⁻: Radical superóxido

OH•: Radical hidroxila

RAGE: Receptor para AGEs

RCS: Espécies Reativas ao Cloro

RL: Radicais Livres

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SRA: Sistema Renina Angiotensina

STZ: Estreptozotocina

TG: Triglicerídeos

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VCAM-1: Moléculas de adesão vascular 1

VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade

VSMCs: Células do músculo liso vascular

α: Alfa

β: Beta

γ: Gamma

ε: Épsilon

1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. Diabetes Mellitus: conceito e classificação	14
2.2. Diabetes experimental	17
2.3. Dislipidemia e diabetes.....	21
2.4. Estresse Oxidativo	22
2.5. NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase	24
2.6. O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e o diabetes.....	25
2.7. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) e o diabetes.....	28
2.8. Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e o diabetes	31
2.9. Diabetes e alterações renais.....	33
3. OBJETIVOS	36
3.1. Geral	36
3.2. Específicos.....	36
4. REFERÊNCIAS	37
5. ARTIGO CIENTÍFICO	55
6. CONCLUSÃO	80
ANEXO A – INTRUÇÕES PARA AUTORES	81

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes gestacional (DG) tem uma incidência de 1 a 28% (NIELSEN et al., 2014) dependendo da população estudada e dos testes diagnósticos utilizados, contribuindo consideravelmente para as malformações congênitas. Crianças de mães diabéticas representam um grupo de pacientes com risco aumentado de mortalidade e morbidade que inclui cardiomiopatia, macrossomia e problemas respiratórios (NOLD; GEORGIEFF, 2004). No Brasil, a prevalência do DG em mulheres com mais de 20 anos, atendidas no Sistema Único de Saúde, é de 7,6% (ANNA et al., 2008).

A exposição à hiperglicemia durante o período gestacional pode ter um impacto em longo prazo sobre a fisiologia do feto, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Estudos epidemiológicos têm encontrado uma forte relação entre distúrbios no meio intrauterino e susceptibilidade ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) na vida adulta (BUNT; TATARANNI; SALBE, 2005; PINNEY; SIMMONS, 2012; INTAPAD et al., 2013). Esta relação sustenta a hipótese da programação fetal (BARKER et al., 1989), a qual sugere que o feto apresenta períodos críticos do desenvolvimento e, eventos durante esses períodos da vida intra-uterina, podem produzir alterações no metabolismo, estrutura, função de órgãos e tecidos na vida adulta (BARKER, 2007).

Evidências experimentais e clínicas têm demonstrado que a exposição prolongada à hiperglicemia é o fator responsável pela patogenia das complicações maternas e perinatais (LAAKSO et al., 1999) como prematuridade, mortalidade perinatal e malformações congênitas do sistema nervoso, cardiovascular, esquelético e renal (CHUGH; WALLNER; KANWAR, 2003). A hiperglicemia é responsável pela formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) estimulando as células endoteliais a expressar moléculas de adesão celular que são ativadas pelas citocinas circulantes, como a interleucina-1 beta (IL-1 β) (REDDY; NATARAJAN, 2011). A interação dos AGEs com o seu receptor (RAGE) ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) contribuindo para o processo inflamatório-proliferativo (WEI et al., 2009; GRADINARU et al., 2013) podendo modular os estágios iniciais da aterogênese. Além disso, os componentes da parede vascular são capazes de produzir numerosas espécies reativas de oxigênio (ROS), como os ânions superóxido (O₂^{•-}), através do metabolismo oxidativo ou da atividade de outras enzimas, como a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADPH) oxidase (CAVE et al., 2006).

Diversos estudos experimentais e clínicos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a relação entre alterações do meio intra-uterino e DCV na vida adulta. Neste contexto,

nosso grupo tem mostrado que o DG induz alterações na prole adulta no que concerne a resposta vasorrelaxante da aorta (PORTO et al., 2010) e que há uma participação de derivados prostanóides da ciclooxigenase 2 (COX-2) na resposta contrátil à noradrenalina em vasos de resistência. Isto poderia conduzir a prole adulta a um quadro de hipertensão arterial (RAMOS-ALVES et al., 2012). Embora, muitos estudos demonstrem a influência da hiperglicemia materna na programação de doenças a curto e longo prazo, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que relacionam à hiperglicemia crônica materna as alterações cardiovasculares que podem ocorrer na prole de animais diabéticos. Neste trabalho, nós investigamos a influência do estresse oxidativo e da expressão do NF- κ B nas alterações induzidas pelo DG na prole adulta.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Diabetes Mellitus: conceito e classificação

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome crônico-degenerativa de etiologia múltipla, decorrente de desordens endócrino-metabólicas associadas à deficiência parcial ou total da secreção de insulina, ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Caracterizado por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, o DM é considerado a doença do século XXI, sendo a 4ª principal causa de mortes nos países desenvolvidos, acometendo 285 milhões de pessoas em todo mundo. Estimativas incluindo todos os 216 países membros das Nações Unidas indicam que este número chegará a 439 milhões em 2030, constituindo-se um grande problema de saúde pública mundial (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2009).

A classificação etiológica do DM foi primeiramente normatizada pela National Diabetes Data Group (NDDG) em 1979. Atualmente a mais utilizada, é a classificação proposta pela Associação Americana de Diabetes (ADA, 2011) e preconizada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009) que compreende quatro categorias clínicas: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (DG).

O DM1, anteriormente conhecido como diabetes juvenil ou diabetes insulino-dependente, acomete 5% a 10% dos pacientes com diabetes e corresponde à destruição das células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, por processos auto-imunes em 80% dos casos (tipo A) ou desconhecidos (forma idiopática ou tipo B), ocasionando deficiência absoluta da insulina. Estudos demonstraram que os linfócitos T são os responsáveis pela destruição das células β , através da lise das células alvo, ou através do reconhecimento direto dos antígenos ligados ao complexo maior de histocompatibilidade, classes I e II, ou através da liberação de citocinas que recrutam macrófagos, resultando em reações de hipersensibilidade retardada (TANNUS et al., 2007).

O DM2 corresponde a aproximadamente 90% a 95% dos casos de diabetes no mundo e é caracterizado por uma diminuição na resposta dos receptores de glicose presentes no tecido periférico e hepático à insulina. Ocorre quando há uma resistência à insulina com uma relativa insulinopenia, ou uma redução na secreção de insulina associada ou não com resistência a insulina (MCLELLAN et al. 2007).

A associação entre fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na patogênese do DM2, permitindo que seja dividido em duas categorias: forma monogênica e forma poligênica. Na forma monogênica, que corresponde entre 5 a 10% dos casos de DM2, observa-se um efeito exclusivamente genético (presença de “diabetogenes”) com pouca interferência dos fatores ambientais (FROGUEL; VELHO, 1999). Uma mutação em um só gene transmitido de forma autossômica-dominante é suficiente para promover a hiperglicemia (LOWE, 2001). O início da doença é freqüentemente precoce e ocorre na presença de concentrações normais ou baixas de insulina. Exemplos de formas monogênicas são o MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), por mutações no gene do receptor da insulina (VELHO; BELLANNÉ-CHANTELOT; TIMSIT, 2002) e o diabetes de origem mitocondrial (VAN DEN OUWELAND et al., 1994).

Na forma poligênica, a hiperglicemia é secundária a defeitos de vários genes. Cada um dos poligenes gera individualmente um efeito muito limitado para o risco do desenvolvimento da doença. Porém, quando transmitidos simultaneamente a um mesmo indivíduo, estes defeitos genéticos poderão ser expressos se houver a presença de fatores ambientais desfavoráveis, como sedentarismo, dieta desbalanceada, o uso de substâncias ilícitas e outros (RAMIREZ-GARCIA et al., 2013). Esses genes atuam em fenótipos intermediários do diabetes que irão influenciar na homeostase glicídica, sensibilidade e/ou secreção à insulina (REIS et al., 2000).

O DG ocorre quando há uma intolerância à glicose de graus variados de intensidade que inicia ou só é diagnosticado durante a gravidez, podendo ou não persistir após o parto (OMS, 1999). Os fatores de risco associados ao DG são semelhantes aos descritos para o DM. Esse tipo de diabetes tem crescido progressivamente atingindo proporções globais nas últimas décadas, acompanhando o aumento do DM2 e da obesidade (LAAKSONEN et al., 2002). A gravidez diabética caracteriza-se por numerosos distúrbios na mãe e no crescimento e desenvolvimento fetal/neonatal.

O DG representa cerca de 90% de todos os casos de DM na gestação, com prevalência de 1 % a 28% de todas as gestações (NIELSEN et al., 2014). Entretanto sua incidência varia de acordo com a população estudada – diferenças associadas a idade materna e origem étnica– bem como o método diagnóstico utilizado (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2009; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Na gestação, ocorrem diversas adaptações fisiológicas e alterações endócrinas e metabólicas, a fim de proporcionar um ambiente ideal para o feto em desenvolvimento (KING, 2000). A placenta, responsável pela troca materno-fetal, fornece ao feto oxigênio,

nutrientes e outras substâncias (SHAFRIR; BARASH, 1987). Por conseguinte, a placenta também produz hormônio lactogênico placentário humano (hPL), progesterona, estrogênios e hormônio de crescimento placentário humano (hPGH) que tanto interferem na produção de insulina quanto modificam a utilização da glicose que vão afetar a mãe e o feto de forma independente (HERRERA et al., 1985; JANSSON et al., 2006).

No início da gestação os níveis crescentes de estrógeno e progesterona provocam hiperplasia das células β pancreáticas com aumento na secreção e sensibilidade a insulina, e consequentemente redução das concentrações circulantes de glicose (CODNER, 2008). Entretanto, na segunda metade do ciclo gestacional, conhecida como fase catabólica, ocorre queda da sensibilidade periférica do organismo materno a ação da insulina. A hiperglicemia resultante, tem por objetivo assegurar a adequada disponibilidade da glicose para atender a crescente demanda metabólica conceptual, visto que cerca de 70% do crescimento fetal ocorre no final da gravidez (NANDI et al., 2010). No rato, o pico dessas adaptações ocorre em torno do 14º dia de gestação (NIEUWENHUIZEN et al., 1997).

Paralelamente, impõe-se a necessidade fisiológica de uma maior produção e liberação de insulina pelo pâncreas materno, numa tentativa de manter a concentração de glicose em níveis normais e garantir o aporte energético necessário para o feto (DOBLADO et al., 2007). A incapacidade do pâncreas em responder o aumento da demanda fisiológica ou sobreposta a insulina, favorece o quadro de hiperglicemia de intensidade variada, desenvolvendo-se o diabetes gestacional (LANGER; CONWAY, 2000).

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

No DG, o comprometimento fetal decorre primordialmente dos altos níveis de glicose materna, que por difusão facilitada alcança o conceito via placenta (RUDGE et al., 2011). A hiperglicemia fetal, por sua vez, promove hiperplasia das células do pâncreas fetal aumentando a produção de insulina. Assim, esse excesso de glicose é captado pelas células dos tecidos fetais e transformado em gordura resultando em macrosomia (RUDGE et al., 2011). Outras complicações fetais/neonatas incluem maior óbito fetal intrauterino, morte

perinatal, retardo no crescimento, icterícia, hipocalcemia, policitemia, hiperbilirrubinemia, distúrbios respiratórios e malformações congênitas e intra-uterinas (FLETCHER, 1981). As malformações causadas pelo DG são multifatoriais e poligênicas, podendo comprometer todos os órgãos, embora o sistema cardiovascular e o renal sejam os mais afetados (GILL-RANDALL et al., 2004; WEST et al., 2011). Estudos experimentais e clínicos demonstraram que a exposição intra-uterina à hiperglicemia materna predispõe a prole ao desenvolvimento de DM2 (ALCOLADO et al., 2002; JONES; OZANNE, 2007), dislipidemia (MERZOUK et al., 2001), obesidade (PETTITT et al., 1983; DABELEA, 2007), alteração na reatividade vascular (HOLEMANS et al., 1999; ROCHA et al., 2005), hipertensão (NEHIRI et al., 2008; KATKHUDA et al., 2012) e diminuição da sensibilidade/secreção de insulina (SEGAR et al., 2009; BLONDEAU, 2011).

2.2. Diabetes experimental

O diabetes tem sido descrito em várias espécies animais, incluindo camundongos, ratos, suínos, ovelhas, coelhos, macacos e cães (HAUSBERGER; RAMSAY, 1959; CAVELLERO; MOSCA, 1953; ABELove; PASCHIKS, 1954; KERN; LOGOTHETOPOULO, 1970; LIKE; CHICK, 1974). No entanto, os modelos experimentais mais utilizados são os roedores, especialmente ratos da linhagem Wistar, devido à facilidade de manutenção, curto período de gravidez e multiparidade, possibilitando estudos sobre fetos múltiplos e suas gerações. A indução do diabetes experimental nesses animais tem sido extensivamente utilizada. O diabetes pode ser induzido experimentalmente por:

- i)** lesão no núcleo ventromedial do hipotálamo (“centro da saciedade”) causa hiperfagia e induz obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência a insulina (KENNEDY et al., 1963);
- ii)** utilização de hormônios anti-insulínicos como a epinefrina e o glucagon, que estimulam a glicogenólise hepática e inibem a glicogênio-sintetase, produzindo um quadro de hiperglicemia (FRANKEL et al., 1984);
- iii)** exposição a alguns vírus como o picornavírus e o vírus da encefalomiocardite, que podem induzir dano pancreático e promover diabetes moderado e transitório em algumas espécies animais (REID, 1981);

- iv) administração de hidrocortisona que leva a hiperglicemia e hiperplasia das células β do pâncreas (FRANKEL et al., 1984);
- v) alterações dietéticas como desnutrição (HEARD; TURNER, 1967) ou dietas hipercalóricas (EL AOUIFI et al., 2007);
- vi) pancreatectomia parcial em ratos induz a uma hiperglicemia de leve a moderada (FOGLIA et al., 1967). A base deste modelo é a remoção de 95% do tecido pancreático. Esse modelo não é frequentemente utilizado, pois tem limitações como a competência necessária para realização desta cirurgia, a taxa de mortalidade pós-operatória elevada (cerca de 20%), a redução inespecífica da massa de células e o longo tempo (2-3 meses), necessário entre o procedimento cirúrgico e os sintomas do diabetes (JAWERBAUM; WHITE, 2010).

Alguns modelos de diabetes são espontâneos como o camundongo NOD (*Non Obese Diabetic*) e o rato BB (*Bio Breeding*) que desenvolvem diabetes tipo 1 (ATKINSON; LEITER, 1999; DELARCHE, 2001; LEITER; HERRATH, 2004). Nestes modelos, as ilhotas pancreáticas são submetidas a um ataque do sistema imunológico, com células T, células B e macrófagos à semelhança da doença humana (KAY ET al., 2000). Os ratos NOD constituem um modelo de diabetes leve, enquanto os ratos BB desenvolvem diabetes grave e cetoacidose que pode ser fatal. Para que sobrevivam é necessário a administração de insulina exógena (NAKHOODA et al., 1977). Um outro modelo é o camundongo Akita que tem uma única mutação autossômica dominante no gene da insulina II interrompendo o processamento normal da insulina e podendo provocar uma falha na secreção de insulina e uma redução da massa de células β (YOSHIOKA et al., 1997).

Os modelos de DM2 são mais complexos e heterogêneos (KTORZA et al., 1997), suas diversas mutações genéticas são transmitidas de geração em geração (COHEN; FROGUEL, 1994; GILL-RANDALL et al., 2004). O rato diabético db/db, por exemplo, resulta de uma mutação autossômica recessiva no gene receptor da leptina (LAMBIN et al., 2007). A maioria dos modelos de DM2 usados para analisar as complicações diabéticas durante a gravidez têm uma origem poligênica, tais como o rato diabético Cohen (ORNOY et al., 2009), o rato Sand (*Psammomys obesus*) (PATLAS et al., 2006), o rato Goto Kakizaki (GK) (CALDERARI et al., 2007), além do rato Outsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) (MORAN; BI, 2006).

- vii) agentes químicos citotóxicos como o aloxano e a estreptozotocina (STZ). Estes modelos de diabetes têm sido amplamente utilizados. As doses apropriadas dessas

drogas agem destruindo seletivamente as células β do pâncreas, levando à deficiência de insulina e hiperglicemia em diferentes espécies animais (DICKINSON et al., 1991). Uma vantagem da obtenção dos animais diabéticos através desta metodologia é por ser relativamente fácil, porém a desvantagem da indução química do diabetes é que os componentes genéticos e imunológicos da doença diabética não estão presentes (JAWERBAUM; WHITE, 2010). No entanto, a destruição química das células β pancreáticas induz uma série de reações pró-inflamatórias semelhantes ao que ocorre na destruição auto-imune das células β em humanos bem como a infiltração de macrófagos (KOLB, 1987). Embora, o aloxano represente o agente com o maior impacto para o entendimento dos mecanismos de apoptose de célula beta, mediado por ROS em DM1 e DM2 (LENZEN, 2008). Devido às suas propriedades químicas, em particular, a maior estabilidade e seletividade, a STZ constitui o agente de escolha para a indução de um estado metabólico diabético em animais.

Descrita inicialmente por Rakieten et al. (1963) e Evans et al. (1965), a STZ foi isolada e caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro a partir da cepa *Streptomyces achromogenes* (MURATA et al., 1999). Sua estrutura molecular corresponde a presença do grupo 2-deoxi-2(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glicopirranose, que destrói seletivamente as células β -pancreáticas, promovendo sua degranulação parcial (RERUP; TARDING, 1969). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ação diabetogênica da STZ sobre as células β pancreáticas (CUNHA et al., 2009).

É importante ressaltar que em comparação a outros tipos celulares, as células β , especialmente as de roedores, são particularmente mais sensíveis à ação diabetogênica da STZ, o que é conferido pela baixa expressão gênica às enzimas antioxidantes e devido ao seu baixo nível de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (KANETO et al., 2002). Entretanto as células β pancreáticas humanas são extremamente resistentes aos efeitos deste antibiótico (YANG; WRIGHT, 2002). O tempo de meia vida da STZ é de cerca de 19 minutos (<http://www.sigmaaldrich.com>). Ela ocasiona alterações e distúrbios hidroeletrólítico e da homeostase semelhantes aos observadas em humanos, como perda de massa corporal, hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria e polifagia que refletem a anormalidade no funcionamento das células β do pâncreas (KEELY et al., 2008). A evidência histológica de lesão das células β é detectável entre uma e sete horas após a administração da STZ, nas 24 horas seguintes o conteúdo de insulina dessas células é reduzido em 95%, estabelecendo totalmente o quadro de hiperglicemia (DAMASCENO, 2002). Várias complicações crônicas

micro e macrovasculares como a neuropatia, nefropatia e cardiopatia diabética, também estão presentes no diabetes experimental (JUNOD et al., 1967; HAKIM et al., 1997; SCHAAN et al., 2001; DE ANGELIS et al., 2002).

Os ratos com diabetes induzido por STZ apresentam redução na atividade física diária, temperatura corporal (HOWARTH et al., 2006), alteração de reflexos cardiovasculares e variabilidade da frequência cardíaca em corações isolados (OLIVEIRA et al., 1997; SCHAAN et al., 2004; DE ANGELIS et al., 2009).

Outros estudos também demonstram que ratas com diabetes induzido por STZ, apresentam diferentes repercussões placentárias em função do nível glicêmico, além de alterações no fluxo uterino-placentário e nas trocas materno-fetais (CALDERON et al., 1999; DAMASCENO, 2002).

Com o objetivo de reproduzir efeitos metabólicos maternos e fetais semelhantes ao diabetes pré-gestacional e DG, a STZ pode ser administrada tanto por via endovenosa (e.v.) quanto intraperitonealmente (i.p.) (DELFINO et al., 2002), variando as doses e a janela de injeção que pode ser realizada no período neonatal (KAYA-DAGISTANLI; OZTURK, 2013), antes do acasalamento (LÓPEZ-SOLDADO; HERRERA, 2003) ou durante a gravidez (RAMOS-ALVES et al., 2012) levando à diabetes grave ou leve e posteriores opostos fenótipos fetais.

Uma preocupação de estudos com STZ durante a prenhez é a possibilidade de que a toxina possa atravessar a placenta e ser diretamente prejudicial para o pâncreas fetal e outros tecidos fetais, e, portanto, tornar a análise de efeitos, em longo prazo, da hiperglicemia intrauterina difícil (RYAN et al., 1995). Nesse contexto, é importante salientar que o desenvolvimento das células β em ratos ocorre principalmente durante a última semana de crescimento fetal (BLONDEAU; BREANT, 2005). Portanto, a indução do diabetes nas primeiras semanas de gestação, não afetaria o pâncreas fetal. Blondeau et al. (2011) mostraram que o pâncreas da prole de ratas Sprague Dawley, submetidas a 35 mg/kg de STZ no dia 0 de gestação, apresentava-se histologicamente normal, sugerindo que o diabetes materno não alterava a massa de células β .

De acordo com a literatura, as comparações entre estudos sobre o diabetes induzido pela STZ em ratos são complexas, devido à ampla variação entre as doses empregadas e os níveis de hiperglicemia alcançados. Junod et al. (1969), estabeleceram a atividade diabetogênica da STZ para ratos Wistar, demonstrando que o diabetes pode ser induzido nas doses de 25 a 100 mg/kg e que a gravidade do distúrbio metabólico é proporcional à dose utilizada. Alguns autores observaram que animais submetidos ao DG induzido por STZ, na

dose de 35 mg/kg, apresentaram níveis de glicose inferiores a 200 mg/dL, ou superiores a 400 mg/dL (LOPEZ-SOLDADO et al., 2003), possivelmente devido à variabilidade da sensibilidade à droga. Ademais, a sensibilidade a STZ depende da espécie animal, sexo, idade e estado nutricional.

Segundo Caluwaerts et al. (2003), o nível normal de glicose encontra-se abaixo de 100 mg/dL, entre 120-300 mg/dL a hiperglicemia é classificada como moderada e acima de 300 mg/dL severa. Evidências sugerem que um ambiente levemente hiperglicêmico está associado a fetos macrossômicos e hipoinsulinêmicos (AERTS; ASSCHE, 1979) e que mães severamente diabéticas podem gerar fetos com baixo peso corporal e malformados (HOLEMANS et al., 1991).

2.3. Dislipidemia e diabetes

A elevação das taxas de lipídeos e lipoproteínas na circulação sanguínea é caracterizada como dislipidemia, a qual é classificada como primária (origem genética), causada pela desordem da síntese e degradação de lipídios, e dislipidemia secundária, que é causada por outras doenças ou uso de medicamentos. O DM2 e a obesidade são classificados como dislipidemia secundária (SANTOS, 2001).

Além da hiperglicemia e suas complicações, a hiperlipidemia que se desenvolve nos pacientes diabéticos, consiste na principal causa de morbidade e mortalidade, devido ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HAFFNER, 1999; GARBER, 2000; STEINER, 2001; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). Segundo Santos (2008), as dislipidemias podem ser classificadas em:

- Hipercolesterolemia isolada: aumento do colesterol total (CT) e/ou lipoproteína de baixa densidade (LDL).
- Hipertrigliceridemia isolada: aumento dos triglicerídeos (TG).
- Hiperlipidemia mista: aumento do CT e dos TG.
- Diminuição isolada da lipoproteína de alta densidade (HDL) ou associada ao aumento dos TG ou LDL.

Esta classificação é válida para indivíduos em dieta livre e sem medicação hipolipemiante há pelo menos três semanas.

O quadro de dislipidemia se estabelece porque a insulina é necessária para a ativação e inativação de enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas, na ausência desse hormônio, a lipase hormônio-sensível permanece ativada, liberando ácidos graxos do tecido adiposo para a circulação (BETTERIDGE, 2001). O fígado responde aumentando a velocidade de síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ricas em triacilgliceróis. Essas lipoproteínas permanecem por mais tempo na circulação porque a ação da enzima lipase lipoprotéica, que seria ativada pela insulina, fica diminuída (LEWIS; STEINER, 1996; BETTERIDGE, 2001) conseqüentemente, os indivíduos diabéticos apresentam concentrações aumentadas de triacilgliceróis e de todas as lipoproteínas que têm a função de distribuir os lipídios para os tecidos extra-hepáticos, como a VLDL e LDL (HIRANO et al., 1991; STEWART, et al. 1994; STEINER, 2001). Por outro lado, ocorre uma diminuição na concentração de HDL colesterol, lipoproteína responsável pela retirada de colesterol dos tecidos (BROWN, 1994; PARIS, et al. 1996; RASHID et al., 2003).

Merzouk et al. (2001), demonstraram que a prole de ratos Wistar expostos ao diabetes gestacional induzido por STZ (40 mg/kg, i.p.), apresentou concentrações séricas de colesterol e de lipoproteínas semelhantes aos controles, entretanto aos três meses, os animais desenvolveram hipercolesterolemia com um aumento em todas as lipoproteínas. Outros autores não encontraram modificações do metabolismo lipídico da prole exposta a STZ (BLONDEAU et al. , 2011).

As controvérsias encontradas na literatura sobre os níveis de triglicérides e colesterol podem ser devido ao período em que foram realizados os experimentos (períodos fetal, pós-natal ou em animais adultos), aos diferentes protocolos utilizados, as diferentes doses de STZ ou a linhagem dos animais (WICHI et al., 2005; CAVANAL et al., 2007).

2.4. Estresse Oxidativo

Evidências científicas sugerem a associação do estresse oxidativo com o desenvolvimento de doenças crônicas, entre elas, doenças auto-imunes, respiratórias, cardiopatias, neoplasias, DM, obesidade e distúrbios neurológicos (MACNEE, 2001; ANTONIADES et al, 2003; STOCKER; KEANEY, 2004). O termo radical livre (RL) refere-se a qualquer átomo ou molécula, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, em sua

última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNER, 2001). Esta configuração química as torna altamente instáveis, com um tempo de meia-vida curto e quimicamente muito reativas. Os RL podem ser divididos em: ROS, RNS (espécies reativas ao nitrogênio) e RCS (espécies reativas ao cloro) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O elemento oxigênio, por definição, pode ser considerado um radical livre, uma vez que possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital, na última camada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, cerca de 2% do oxigênio consumido sofre redução tetravalente, resultando na formação de H₂O. Durante esse processo, são formados intermediários reativos e tóxicos, as ROS, entre elas o O₂^{•-}, o radical hidroxila (OH[•]), a hidroperoxila (HO₂) e o não-radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As ROS podem ser formadas por atividade enzimática intra e extracelular seja no citoplasma, no retículo endoplasmático, nos lisossomos, nos peroxissomos, na membrana plasmática ou nuclear. A xantina oxidase, o citocromo P450 e a NADPH oxidase são as principais enzimas envolvidas neste processo (MATSUO; KANEKO, 2001).

Adicionalmente, as ROS também podem ser geradas em outros eventos bioquímicos na célula, como, por exemplo, em processos inflamatórios, no catabolismo de ácidos graxos, na degradação da xantina a ácido úrico, redução de flavinas e tióis, resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e auto-oxidação de catecolaminas. Entretanto o principal sítio de formação endógena de ROS parece estar localizado na cadeia respiratória mitocondrial onde de 2% a 5% dos elétrons são desviados para a produção de RL, como o superóxido (BARJA, 2007).

Em níveis fisiológicos, as ROS podem estar envolvidas em funções celulares importantes, como no controle da pressão sanguínea e da ventilação respiratória, na sinalização celular, na contração muscular, na apoptose, na diferenciação e desenvolvimento celular, na aderência de leucócitos a células endoteliais, ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra agentes patogênicos (DROGE, 2002). Contudo, quando a produção e liberação das ROS são alteradas por fatores ambientais ou patológicos, as suas concentrações excedem a capacidade de eliminação pelos antioxidantes e verifica-se o estado de estresse oxidativo, que resulta de um desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes das células (VALKO et al., 2007). A geração de um desequilíbrio redox ativa as cascatas celulares que tem como consequência a formação de produtos, que causam

danos a lipídios e proteínas, responsáveis pelas complicações diabéticas em longo prazo (MOHAMED et al., 1999).

Trabalhos realizados por Lenzen et al (1996), demonstraram que os níveis de expressão das enzimas antioxidantes apresentaram-se reduzidos nas células β do pâncreas, comparado com outros tecidos, confirmando que estas células são afetadas por um ambiente oxidativo nocivo, atribuído a presença de radicais livres. Raza e John (2004), observaram um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de peróxidos no fígado, rim, cérebro e pele de ratos recém-nascidos oriundos de mães com diabetes gestacional induzida por 60 mg/kg de STZ. Outros estudos também demonstraram que o estresse oxidativo aumenta a resistência a insulina e a adiposidade promovendo processos inflamatórios em estágios iniciais do desenvolvimento da doença coronariana associada com o DM2 (INOBUCHI et al, 2003).

2.5. NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase

Embora múltiplas vias possam resultar na geração de ROS, estudos recentes indicam que o complexo enzimático da NADPH oxidase é a principal fonte dessas espécies reativas na vasculatura. Esta oxidase está envolvida na patologia vascular provocada por hipercolesterolemia, hipertensão e DM (LAMBETH, 2007). Originalmente encontrada em neutrófilos, NADPH oxidase compreende um complexo proteico que apresenta componentes na membrana celular e no citoplasma. O componente associado à membrana, o citocromo b558-oxidase, é formado por uma subunidade maior, a gp91phox, e uma menor, a p22phox. Além dessas, a enzima compreende três subunidades citoplasmáticas a p47phox, a p67phox e a p40phox, além de uma proteína G regulatória (Rac2). A ativação da NADPH oxidase tem início com a fosforilação em serina da subunidade citoplasmática p47phox, promovendo sua migração para a membrana, onde, juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (GRAY et al., 2013).

Subunidades homólogas à gp91phox, constituem a família Nox. Atualmente esta família é composta por sete membros: Nox1, Nox2 (conhecida como gp91phox), Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 [Dual oxidase] (PARAVICINI, 2002). Nesta família, a Nox4, uma proteína de 578 amino ácidos, é quase idêntica (39%) em tamanho e estrutura a

gp91phox. A Nox4 é expressa no rim, sendo também encontrada no sistema vascular e células musculares lisas (PARAVICINI, 2002).

MONA-SEDEEK et al. (2012) demonstrou que a Nox4 está aumentada durante a fase de formação do ateroma, cujo aparecimento se dá de forma reduzida em lesões mais avançadas. Guo et al. (2007) observou que a expressão miocárdica de p22 (phox) e de Nox4, apresentavam-se elevadas em ratos diabéticos, acompanhados por um aumento da produção de superóxidos. No entanto, os estudos que referenciam a expressão da Nox4 na prole de animais diabéticos são poucos.

Pelo exposto, a NADPH-oxidase, pode ser um alvo potencial no conhecimento e tratamento das complicações cardiovasculares do diabetes.

2.6. O fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e o diabetes

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB; do inglês, *nuclear factor kappa B*) foi descoberto primeiramente em linfócitos B como um regulador da transcrição da cadeia leve da κ-imunoglobulina. Mas, apesar do NF-κB ter sido caracterizado pela primeira vez em células do sistema hematopoiético, investigações posteriores revelaram que a ativação do NF-κB pode ocorrer na maioria dos tipos de células (NABEL; BALTIMORE, 1987). Consiste em uma família de proteínas, que em mamíferos é composta por cinco subunidades: a RelA (p65), a RelB, a c-Rel, o NF-κB1 (p50 e seu precursor p105) e o NF-κB2 (p52 e seu precursor p100) (MEFFERT; BALTIMORE, 2005). Todos os membros dessa família de fatores de transcrição são caracterizados pela presença de uma região N-terminal conservada com cerca de 300 aminoácidos denominada domínio de homologia Rel (RHD), que é responsável pela ligação ao ácido desoxirribonucléico (DNA), pela interação com proteínas inibitórias kappa Bs (IκBs) e dimerização (IWAI; TOKUNAGA, 2009). A região C-terminal contém um domínio de transativação, necessário para iniciar a atividade transcricional. Próximo a esta região encontra-se o sinal de localização nuclear (NLS). Ao contrário da p65, c-Rel e RelB, a p50 e p52 não contêm domínios de transativação. No entanto, estes dois membros desempenham um papel importante na modulação e na especificidade do NF-κB (FUJITA et al., 1993; LI; VERMA, 2002).

As subunidades p50 e p52 são sintetizadas através do processamento proteolítico após fosforilação dos seus precursores p105 e p100, respectivamente. O processamento da p 105

ocorre de forma constitutiva enquanto que o processamento da p100 depende da sinalização química (MEFFERT; BALTIMORE, 2005).

As proteínas da família do NF- κ B se dimerizam em diferentes tipos de combinações, podendo formar heterodímeros ativadores (p50-p65) ou homodímeros inibitórios da transcrição gênica (p50-p50 e p52-p52). Embora, os homodímeros p50 e p52 sejam repressores da transcrição do NF- κ B, eles podem participar através da formação de heterodímeros da transativação com RELA, RelB ou c-Rel . Além disso, eles também se ligam à proteína nuclear Bcl-3, formando potentes ativadores de transcrição (PATEL; SANTANI, 2009). O heterodímero p65/p50 é o mais abundante na maioria das células e o mais comumente associado aos efeitos do NF- κ B (KUMAR et al., 2004; JANSSENS; TSCHOPP, 2006).

Quando não estimulado, o NF- κ B localiza-se no citoplasma associado à uma classe de proteínas, as I κ Bs. Até o momento, sete I κ Bs foram identificadas: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 e os precursores anteriormente mencionados, p100 e p105 (BAKER et al., 2011). Caracterizam-se por uma cadeia C-terminal contendo repetições de 30 a 33 aminoácidos denominados repetições ankirina que são importantes para a interação com os dímeros do NF- κ B. As repetições de ankirina interagem com uma região no RHD das proteínas NF- κ B, impedindo a exposição das sequências do NLS localizadas no NF- κ B, bloqueando a sua translocação nuclear (HAYDEN; GHOSH, 2008).

Quando ocorre um estímulo celular que ativa a via de sinalização do NF- κ B, há fosforilação da proteína I κ B o que induz a sua ubiquitinação e seguinte degradação pelo proteossoma, o que faz com que as NLS do NF- κ B fiquem expostas e o fator de transcrição migre para o núcleo, onde induz a expressão de genes específicos (GHOSH; BALTIMORE, 1990).

A fosforilação do I κ B é feita por kinases específicas: as IKKs (quinase-kappa B). As IKKs são um complexo proteico composto por 3 subunidades: IKK- α , IKK- β e IKK- γ (ou NEMO) (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). A IKK- α e IKK- β apresentam atividade catalítica, entretanto a IKK- γ é a subunidade regulatória e não apresenta atividade catalítica, desempenhando um papel essencial para a ativação do complexo IKK (RUDOLPH et al., 2000; YAMAOKA et al., 1998). Existem duas vias descritas para a ativação do NF- κ B: a clássica e a alternativa. A primeira é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à imunidade inata, à antiapoptose e à sobrevivência celular (XIAO, 2004). Esta via é tipicamente ativada por citocinas pró-inflamatórias ou patógenos e envolve a ativação do complexo IKK através da fosforilação das subunidades catalíticas quinases IKK α

e da IKK β e a regulação de proteínas não enzimáticas (NEMO). O complexo IKK ativado leva à fosforilação da I κ B α nas serinas 32 e 36 ou da I κ B β nas serinas 19 e 23. Estas fosforilações levam à ubiquitinação da I κ B e, sua posterior proteólise pelo proteossoma 26S. Após degradação do I κ B os dímeros do NF- κ B (por ex., p50-p65) são liberados e translocados para o núcleo através da interação com carioferinas (transportadores citoplasmáticos-núcleos) onde se ligarão ao DNA e atuarão na regulação da transcrição de genes específicos (KALTSCHMIDT et al., 2005; LI et al., 2008a).

A via alternativa por sua vez, está associada com alternância na imunidade adaptativa, incluindo o desenvolvimento de órgãos linfóides secundários e maturação de células beta (TAK; FIRESTEIN, 2001; SMALE, 2011). Esta via de sinalização é mediada pela quinase indutora de NF- κ B (NIK) que ativa homodímeros IKK- α a fosforilar a p100/RelB utilizando uma via independente de NEMO (IKK- γ). Posteriormente, a p100/RelB é ubiquitinada e degradada pela proteossoma originando a p52. O complexo IKK torna-se ativo e promove a translocação do dímero formado, p52-RelB, para o núcleo onde ativa a transcrição de genes específicos (XIAO et al., 2001; SRIVASTAVA; RAMANA, 2009).

É importante salientar que o NF- κ B pode ser ativado por exposição das células a lipopolissacarídeos (LPS) ou citocinas inflamatórias, tais como TNF- α ou IL-1, fatores de crescimento, radicais livres, partículas inaláveis, infecções virais ou a expressão de determinados produtos de genes virais ou bacterianas, irradiação ultra-violeta, ativação de células B ou T, e por outros estímulos fisiológicos e não fisiológicos. Porém os mais potentes ativadores do NF- κ B são as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α , os quais causam a fosforilação rápida de I κ Bs em dois locais dentro do seu domínio N-terminal de regulamentação (LI et al., 2008b)

O NF- κ B ativado controla a expressão de cerca de 200 genes alvo. Muitos deles estão envolvidos no início e progressão de aterosclerose, incluindo citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (COLLART et al., 1990; HOFFMANN; BALTIMORE, 2006). Além disso, o NF- κ B foi identificado *in situ* em placas ateroscleróticas humanas, na camada íntima e média, nas áreas de lesão em células musculares lisas, macrófagos e células endoteliais. O NF- κ B ativado também foi detectado em células da íntima encontrada em artérias coronárias de porcos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica (WILSON et al., 2000). Entretanto, está quase ou totalmente ausente em vasos desprovidos de aterosclerose (BRAND et al., 1996).

Vários estudos têm destacado a ativação do NF- κ B pela hiperglicemia. Lander et al. (1997) demonstrou que os AGEs ativam diretamente o NF- κ B nas células do músculo liso vascular (VSMCs). Estas células cultivadas em condições elevadas de glicose apresentaram

maior atividade do NF- κ B no estado basal e em resposta a citocinas do que aquelas cultivadas em condições normoglicêmicas. Ainda, foi observado que na cardiomiopatia diabética, concentrações elevadas de glicose circulante e lipoproteínas LDL / VLDL estimulam o miocárdio à ativação do NF- κ B (MAZIERE; MAZIERE 2009; MIN et al., 2009) e à liberação de peptídeos vasoativos e de fatores crescimento pelas células circulantes e locais (BRASIER et al., 2000; FANG et al., 2004; PLANAVILA et al., 2005; SCHORLEMMER et al., 2008). Também, foi indicado um papel pró-apoptótico do NF- κ B em ilhotas humanas em resposta a citocinas (GIANNOUKAKIS et al., 2000).

É importante salientar que a geração de espécies reativas de oxigênio pode ser um passo comum em todas as vias de sinalização que conduzem para a degradação de I κ B e acumulação nuclear de NF- κ B. O suporte para este conceito vem de uma variedade de estudos que mostram que os diversos agentes que podem ativar NF- κ B elevam os níveis de espécies reativas de oxigênio e diminuem os antioxidantes. A super expressão de enzimas antioxidantes podem inibir a ativação do NF- κ B (COLLINS; MYRON, 2001). Nishio et al. (1998) e Kumar et al. (2013) por exemplo, demonstraram que o estresse oxidativo está envolvido na ativação do NF- κ B nos tecidos cardíacos de animais diabéticos. Desse modo, a via do NF- κ B une as respostas inflamatórias e metabólicas, constituindo um ponto importante para uma melhor compreensão das doenças e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (BAKER et al., 2011).

2.7. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) e o diabetes

Anteriormente, acreditava-se que não havia relação causal entre a hiperglicemia e as complicações do diabetes. Entretanto, nas últimas décadas, estudos experimentais e clínicos comprovaram a existência dessa relação (BROWNLEE; CERAMI, 1981; TANGI et al., 2000; GROOP et al., 2005). Embora o grau de hiperglicemia esteja diretamente correlacionado com a extensão das complicações do diabetes, a compreensão desses mecanismos ainda é parcialmente desconhecida. Vários autores já demonstraram que os produtos finais de glicação avançada (AGEs) possuem um importante papel na patogênese das complicações do diabetes (BAYNES, 2002; JAKUS; RIETBROCK, 2004; MONNIER et al., 2005). Os AGEs constituem uma grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino-carbonila, de natureza não enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003). Embora parte dos

mecanismos que levam à formação dos AGEs permaneçam ainda desconhecidos, o processo que leva a formação dos AGEs, inicia-se com a via clássica da reação de Maillard, também denominada glicação – esta tem de ser distinguida da glicosilação, a qual é uma reação enzimática (BIERHAUS et al., 1998).

Nesta reação, ocorre a formação de base de Schiff instável, gerada pela condensação do grupo carbonila de açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina de aminoácidos (como resíduos lisina ou arginina), proteínas, lipídeos ou ácidos nucleicos. Por sua vez, a base de Schiff sofre rearranjos adicionais, tornando-se mais estável estruturalmente, formando o produto de Amadori, ou produtos iniciais da reação de Maillard. As bases de Schiff e os produtos de Amadori são produtos de reações reversíveis. No entanto, os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonilas altamente reativos, que podem reagir com grupos aminas primários acessíveis, dando origem aos produtos avançados da reação de Maillard – AGEs (BIERHAUS et al., 1998). Uma vez formados os AGEs são irreversíveis: e mantêm-se ligados às proteínas por toda a sua meia-vida e, mesmo que a hiperglicemia retorne a normalidade, os níveis de AGEs nos tecidos afetados são mantidos. Além da formação endógena, esse produtos podem ser introduzidos no organismo por fontes exógenas, como a dieta e o fumo (LESLIE et al., 2003; PEPPA et al., 2003).

A concentração de AGEs resulta do equilíbrio de dois processos opostos: a taxa de formação/ingestão de AGEs e a taxa de degradação/eliminação destes produtos por sistemas enzimáticos (JAKUS; RIETBROCK, 2004) como a oxaldeído redutase e a aldose redutase (THORNALLEY, 2003). Os AGEs formados nos tecidos, podem ser degradados a partir da proteólise extracelular ou por células “*scavengers*”, como os macrófagos, que endocitam AGEs via receptores e os liberam como pequenos peptídeos de AGEs para serem excretados pelos rins (VLASSARA; PALACE, 2002). No entanto, a taxa de formação de AGEs pode exceder a capacidade do organismo em degradá-los e a geração/ acumulação de AGEs aumenta em uma proporção que esses sistemas podem ser superados (JAY et al., 2006). Desse modo na presença de até mesmo uma moderada hiperglicemia, as reações de glicação ocorrem mais rápida e intensivamente, modificando as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (LAPOLLA et al., 2005). No interior da parede dos vasos, os AGEs causam enrijecimento da vasculatura abolindo a atividade do NO e da prostaciclina, além de interagir com receptores para modular grande número de propriedades celulares. Eles não apenas diminuem os níveis desses dois importantes fatores relaxantes derivados do endotélio, mas também induzem a produção de endotelina-1 (potente vasoconstritor) produzido pelas células endoteliais através da ativação do NF-κB

(BIERHAUS et al., 1998; BASTA et al., 2004; GOLDIN et al., 2006). Adicionalmente, a membrana basal glicosilada dos capilares causa a fixação de proteínas plasmáticas tipo albumina, sendo, em parte, responsáveis pela sua maior espessura, característica da microangiopatia diabética (NOBRE; SERRANO, 2005). Entre uma variedade de proteínas ligantes de AGEs o receptor RAGE (receptor de produtos finais de glicação avançada) é provavelmente a molécula mais bem caracterizada. O RAGE pertence à superfamília das imunoglobulinas de superfície celular. As regiões para o NF- κ B e para a IL-6 estão localizadas no gene promotor do RAGE, controlando a expressão desse receptor e associando o RAGE às respostas inflamatórias (MÉNDEZ, 2003).

O RAGE é minimamente expresso nos tecidos e na vasculatura sob condições fisiológicas. No entanto, sua expressão está aumentada em diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, e astrócitos sob condições de excesso de AGEs (GOLDIN et al., 2006).

A interação dos AGEs com RAGE nas superfícies celulares amplificam suas respostas inflamatórias em decorrência de doenças crônicas, como o diabetes. Isso ocorre porque as células, como macrófagos, fibroblastos e endoteliais, quando ativadas pelos AGEs, produzem maior quantidade de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α . Além disso, ao se ligar ao seu receptor na célula, os AGEs alteram o metabolismo celular, causando liberação de radicais de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo, responsável, em parte, por injúrias vasculares e também pelo aumento da expressão da molécula de adesão vascular (VCAM-1), capaz de agregar monócitos na parede endotelial (SCHMIDT et al., 1996; MÉNDEZ, 2003). Tamarat et al. (2003), demonstraram que os níveis plasmáticos de AGEs apresentavam-se elevados em camundongos diabéticos e que o tratamento por 8 semanas com aminoguanidina era capaz de reduzir esses níveis. Outros autores mostraram que os níveis de AGEs e RAGE estão aumentados em camundongos diabéticos tratados com STZ e que o bloqueio de RAGE é capaz de reduzir a área da lesão aterosclerótica, apoiando a idéia de que RAGE é uma parte crucial do desenvolvimento e aceleração da aterosclerose (SCHMIDT et al., 2001; BUCCIARELLI et al., 2002). Desta forma, os AGEs modulam os estágios iniciais da aterogênese, desencadeando um processo inflamatório-proliferativo e contribuindo para a propagação da inflamação e para a perturbação vascular na doença já estabelecida (BIERHAUS et al., 1998; BASTA et al., 2004; GOLDIN et al., 2006).

2.8. Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e o diabetes

Descritas pela primeira vez por Witko-Sarsat; Friedlander; Capeiller-blandin (1996), os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) são proteínas, predominantemente albumina e seus agregados, formados durante o estresse oxidativo através da ação de oxidantes clorados, principalmente do ácido hipocloroso e cloraminas, resultantes da atividade da mieloperoxidase (KALOUSOVA et al., 2005).

A concentração plasmática de AOPP está estreitamente correlacionada aos níveis de ditirosinas que permitem reticulação - uma característica da proteína oxidada - e pentosidina, um marcador de glicosidação proteica firmemente correlacionado ao estresse oxidativo (ZHOU et al., 2010).

AOPP são estruturalmente semelhantes aos AGEs e exercem atividades biológicas similares como a indução de citocinas pró-inflamatórias e moléculas adesivas, incluindo a interação com receptores RAGE. Ademais, possuem um mecanismo de formação em comum que é o estresse oxidativo (KALOUSOVA; SKRHA; ZIMA, 2002; ŠONKA et al., 2008). Assim, AOPP são considerados como marcadores de dano oxidativo à proteínas. Alguns autores mostraram que coexiste acumulação AOPP com diminuição do nível de glutathiona peroxidase (GSH-Px), enquanto que a concentração plasmática de malondialdeído permanece estável, suportando a hipótese de que AOPP são marcadores mais precisos do estresse oxidativo do que produtos de peroxidação lipídica (WITKO-SARSAT; FRIEDLANDER; CAPEILLER-BLANDIN, 1996). Altos níveis de AOPP foram encontrados em pacientes diabéticos com ou sem complicações microvasculares (MARTIN-GALLAN, 2003; ATABEK et al., 2006; KRZYTEK-KORPACKA et al., 2008) e independente do seu tipo, embora esses níveis foram mais elevados nos portadores de DM2 (1,7-2 vezes e 1,2 vezes no DM tipo 1) (KALOUSOVA; SKRHA; ZIMA, 2002). Isso pode indicar a presença de estresse oxidativo em ambos os tipos de diabetes mellitus com o seu aumento no tipo 2.

Kaneda et al. (2002) mostraram que pacientes com doença isquêmica do coração, provavelmente, apresentam valores elevados de AOPP que se assemelham aos pacientes dialisados, diferindo significativamente de indivíduos saudáveis (KALOUSOVA; SKRHA; ZIMA, 2002; 2003). Níveis plasmáticos de AOPP estão intimamente correlacionadas a espessura da camada íntima da carótida (DRUEKE et al., 2002) e eventos ateroscleróticos cardiovasculares (DESCAMPS-LATSCHA et al., 2005). Em modelos de hiperlipidemia, em

coelhos, foi mostrado que a administração crônica de AOPP acelerou o desenvolvimento da aterosclerose (LIU et al., 2006).

Os estudos envolvendo AOPP podem fornecer informações valiosas sobre a origem e a progressão da aterosclerose bem como em relação entre o estresse oxidativo e a origem da síndrome coronária aguda, parecendo ser uma alternativa viável e um marcador adequado do estresse oxidativo. AOPP podem ser utilizados como fator prognóstico para formas graves da doença cardiovascular (PIWOWAR, 2010).

Por outro lado, esta família de compostos de proteínas oxidadas, também emergiu como uma nova classe de mediadores patogênicos renais. Witko-Sarsat; Friedlander; Capeiller-blandin (1996) demonstraram que os AOPP apresentam-se elevados em pacientes com insuficiência renal. O aumento começa em um estágio inicial de insuficiência renal crônica e aumenta gradualmente com a progressão da insuficiência renal, como salientado pela relação inversa significativa entre as concentrações plasmáticas de AOPP e da taxa de filtração glomerular. Em segundo lugar, e mais importante, a acumulação de AOPP durante o curso da crônica insuficiência renal não só está relacionada com a diminuição da excreção renal, mas também está intimamente associado com vários marcadores imunoinflamatórios. AOPP não é apenas um marcador de estresse oxidativo, mas também atua como um mediador da doença inflamatória (SELJELFLOT; AASE; EID, 2002; WITKO-SARSAT; GAUSSON; DESCAMPS-LATSCHA, 2003).

Estudos recentes sugerem que o acúmulo crônico de AOPP promove a inflamação no rim de pacientes diabéticos (LI et al., 2007; SHI et al., 2008). Estes dados sugerem que as proteínas oxidadas, por si próprias, podem contribuir para o estresse oxidativo persistente como uma classe de mediadores pró-inflamatórios em tecidos, uma vez que, a acumulação de AOPP ocorre a partir de um estágio inicial do diabetes, quando microangiopatia não está presente (MARTIN-GALLAN et al, 2003).

Outros trabalhos mostraram que a exposição dos adipócitos aos AOPP conduziram a superexpressão de TNF-alfa e IL-6 através da ativação do NF- κ B (LI et al., 2007). AOPP também induziram resistência à insulina, em adipócitos, que foi parcialmente mediada pela resposta inflamatória (LIU et al., 2006). Outros trabalhos sugerem que o efeitos pró-inflamatórios de AOPP sobre o rim diabético pode ser principalmente por meio da ativação da NADPH oxidase (LIANG et al., 2012). Estes dados fornecem uma nova visão sobre a patogênese da inflamação renal no diabetes e sugerem que a acumulação de AOPP pode ser um alvo terapêutico, pelo menos para prevenção ou retardamento da progressão da complicação renal no diabetes (SHI et al., 2008).

2.9. Diabetes e alterações renais

O número total de néfrons é uma variável biológica que é definida em seres humanos antes do nascimento. Estima-se que 60% dos néfrons podem se desenvolver durante o terceiro trimestre e finalizado em 36 semanas de gestação. Em ratos a nefrogênese se completa em até oito dias após o nascimento, sem novos néfrons formados após esse período (MANÑALICH et al., 2001).

O número final de néfrons é, sem dúvida, determinado geneticamente, entretanto um conjunto crescente de evidências indica que, além disso, o número glomerular é influenciado por fatores não-genéticos que afetam o ambiente intra-uterino, como desnutrição materna, hiperglicemia, mau funcionamento da placenta, uso de glicocorticóides, deficiência de vitamina A e ingestão de sal (KELLER et al., 2003; PESCE et al., 1994). Os eventos ambientais que influenciam a formação dos néfrons ocorrem ao mesmo tempo em que as alterações importantes ocorrem no DNA, particularmente metilação e acetilação de histonas que modificam a expressão dos genes na vida adulta. Estas alterações podem interagir com mutações de vários genes conhecidos por estarem envolvidos na nefrogênese (FRANCO et al., 2003).

Durante uma nefrogênese normal, os eventos apoptóticos ocorrem normalmente durante toda a organogênese renal até que a formação do rim esteja completa (LIM et al., 2010). No entanto, em certas circunstâncias, como por exemplo, o DG, o meio intrauterino com elevadas concentrações de glicose contribui para a apoptose em células que normalmente não sofrem apoptose, então a formação dos néfrons é alterada e resulta em colapso do néfron (LUYCKX; BRENNER, 2010).

Em modelos animais, a hiperglicemia moderada durante o desenvolvimento fetal afeta o peso ao nascimento e reduz o número de néfrons na prole (AMRI et al., 2001), o que é consistente com os resultados encontrados em humanos (TRAN et al., 2008). Estudos mostram que filhos de ratas diabéticas induzidas por STZ apresentam nefrogênese prejudicada, com redução de 30% no número de néfrons. (DUONG VAN HUYEN et al., 2003; HOKKE et al., 2013). Tem sido postulado que a redução no número de néfrons age como um insulto renal primário visto que os mecanismos de compensação são iniciados para manter a função renal normal (MORITZ et al., 2009). No entanto, com o estilo de vida e subsequentes insultos (insultos secundários), o rim atinge os seus limites de compensação, como resultado há um declínio na função renal e ocorre o início da patologia renal (BAKER;

HOY; THOMAS, 2005). Os mecanismos subjacentes pelos quais o número de néfrons pode ser afetado e/ou a função do néfrons seja alterada, ainda não estão completamente elucidados (MERCURIO; MANNING, 1999). Entretanto, alguns estudos sugerem que uma deficiência, mutação, ou expressão anormal de genes do sistema renina-angiotensina (SRA) durante a organogênese em modelos animais experimentais, leva a rins anormais, com um decréscimo do número de néfrons finais (CHEN et al., 1997; MATSUSAKA et al., 2000).

Ainda, estudos experimentais têm indicado uma diminuição no número de néfrons na hipertensão, (PATTINSON, 1990) o que está de acordo com a hipótese de Brenner (1985) que afirma que o déficit de néfrons ao nascimento predispõe a redução da excreção renal de sódio, levando a uma susceptibilidade a hipertensão o que tornaria o rim vulnerável a danos renais levando a uma perda progressiva da função renal (citado por BRENNER et al., 1988).

Embora em muitos modelos experimentais um baixo número de néfrons esteja associado com redução do peso ao nascimento e hipertensão na vida adulta, há outros modelos que associam diminuição no número de néfrons e hipertensão, apesar do peso normal ao nascimento (NEHIRI et al., 2008).

Outros autores consideram que as alterações renais ocorrem independentemente de mudanças na pressão arterial. Rocha et al. (2005) e Magaton et al. (2007), demonstraram que ratos filhos de mães diabéticas poderiam desenvolver hipertensão não associada ao déficit no número de néfrons. Isto sugere que as adaptações fisiológicas renais poderiam compensar adequadamente o déficit congênito no número de néfrons para normalizar a função renal na ausência de um aumento da pressão arterial. Entretanto Franco et al. (2003) sugeriu que o número de néfrons por si só, não leva à hipertensão, mas também provavelmente durante quanto tempo e qual o ambiente em que o déficit de néfrons ocorreu, ou seja, durante um período crítico do desenvolvimento.

Por outro lado, um meio hiperglicêmico e a ativação do NF- κ B estão relacionados com o desenvolvimento da nefropatia diabética (MORCOS et al., 2002). Suas duas vias funcionais foram estudadas nos rins diabéticos (FLYVBJERG et al., 2004; STARKEY et al., 2006). Os cinco membros da família do NF- κ B foram identificados, entretanto parece que a relação p65 e p50, em particular, podem contribuir para a apoptose mediada por TNF- α , e ROS (XUE et al., 2005; DUTTA et al., 2006; NAKANO et al., 2006; PERKINS; GILMORE, 2006).

Em um modelo de diabetes experimental em ratos, Lee et al. (2004) relataram a interação entre o NF- κ B (subunidade p65) e o receptor da angiotensina II. O que levantou a hipótese de que em altas concentrações de glicose intrauterina a ativação do sistema renina

angiotensina e a sinalização do NF- κ B são dois elementos-chave envolvidos no processo de apoptose de néfrons e dismorfogênese, reduzindo o tamanho dos rins.

Em relação à prole de mães diabéticas, o impacto funcional das vias de apoptose do NF- κ B é desconhecido. Porém, foi observado que a via do NF- κ B foi regulada nos rins da prole de animais diabéticos (TRAN et al., 2008). Além disso, subunidades de NF- κ B, p50 e p65, foram reguladas e translocadas do citosol para o núcleo em células tubulares proximais da prole diabética. Em conjunto, os dados da literatura sugerem que a ativação do NF- κ B pode evocar vários genes pró e anti-apoptóticos, que (JANSSEN et al., 2004; DUTTA et al., 2006; PERKINS; GILMORE, 2006) pode levar à apoptose de células tubulares proximais, consequentemente resultando em colapso néfron e, finalmente, na deficiência de néfrons.

Vários autores têm mostrado que a hiperglicemia está associada a uma acumulação renal de AGEs em pacientes portadores de nefropatia diabética (COOPER; GILBERT; EPSTEIN, 1998; ZHENG et al., 2001). Estudos clínicos sugerem que a disfunção renal seja derivada dos elevados níveis de glicose materna e subsequente formação dos AGEs (FORBES et al., 2002; KARACHALIAS et al., 2003). A exposição a uma hiperglicemia prolongada, dislipidemia, e estresse oxidativo no diabetes aumenta a produção e acumulação destes compostos (VLASSARA; PALACE, 2002) no rim, na retina e em outros locais de dano microvascular (MAKITA et al., 1991). A sua importância como mediadores de lesão renal tem sido amplamente demonstrada por estudos que usam inibidores de formação de AGEs (FORBES et al., 2004; 2005) ou restrição dietética de AGEs (URIBARRI et al., 2003) para retardar a nefropatia sem influenciar o controle glicêmico. Também foi demonstrado que em ratos com diabetes induzida por STZ, os níveis de AGEs apresentam-se elevados (LU et al., 2011). Estudos *in vivo*, mostram que a exposição de animais adultos saudáveis a AGEs, na ausência de hiperglicemia, é capaz de gerar lesões glomerulares semelhantes as observadas no diabetes (DOI et al., 1992; VLASSARA et al., 1994). Além de induzir várias anormalidades bioquímicas e hemodinâmicas que também podem ser responsáveis por alterações renais (LARGER et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a influência do diabetes gestacional sobre a expressão proteica do NF- κ B e de marcadores do estresse oxidativo, envolvidos na aterosclerose prematura decorrente do diabetes, bem como investigar o aparecimento de possíveis alterações renais na prole.

3.2. Específicos

1. Determinar as taxas plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL, AGEs e de AOPP;
2. Determinar a expressão protéica do NF- κ B;
3. Determinar a expressão gênica da IL-1 β e Nox4;
4. Quantificação do número de néfrons na prole diabética.

4. REFERÊNCIAS

- ABELOVE, W. A.; PASCHIKS, K. E. Comparison of the diabetogenic action of cortisone and growth hormone in different species. **Endocrinology**, v. 55, p. 637-640, 1954.
- AERTS, L.; ASSCHE, F. A. V. Is gestacional diabetes an acquired conditions? **J Devel Biol**, v.1, p. 219-225, 1979.
- ALCOLADO, J.C.; LAJI, K.; GILL-RANDALL, R. Maternal transmission of diabetes. **Diabet Med**, v. 19 , n. 2, p. 89–98, 2002.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, p. S62-69, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Stantards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, p. S4-42, 2006.
- AMRI, K. et al. Altered nephrogenesis due to maternal diabetes is associated with increased expression of IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in the fetal kidney. **Diabetes**, v. 50, p. 1069 –1075, 2001.
- ANNA, V. et al. Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005. **Diabetes Care**. v. 31, n. 12, p. 2288-2293, 2008.
- ANTONIADES, C. et al. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. **Herz.**, v.28, p. 628-638, 2003.
- ATABEK, M. E. et al. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. **Eur J Pediatr**, v. 165, v. 753-756, 2006.
- ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? **Nat. med.** v. 5, n. 6, p. 601-604, 1999.
- BAKER, P. R.; HOY, W. E.; THOMAS, R. E. Cost-effectiveness analysis of a kidney and cardiovascular disease treatment program in an Australian Aboriginal population. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 12, p. 22–31, 2005.
- BAKER, R.G.; HAYDEN,M.S.; GHOSH, S. NF-κB, inflammation and metabolic disease. **Cell Metab**, v.13, n.1, p.11–22, 2011.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Res**, v.10, p. 215-223, 2007.
- BARKER, D .J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007.

- BASTA, G.; SCHIMIDT, A. M.; CATERINA de R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res**, v. 63, n. 4, p. 582-592, 2004.
- BAYNES, J.W. The Maillard hypothesis on aging: time to focus on DNA. **Ann NY Acad Sci**, v. 959,n.3, p. 60-67, 2002.
- BETTERIDGE, D.J. The current management of diabetic dyslipidaemia. **Acta Diabetol**, v. 1, p. S15-S19, 2001.
- BIERHAUS, A.; HOFMAN, M.A.; ZIEGLER, R.; NAUROTH, P.P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res**, v.37, n.3, p.586-600, 1998.
- BLONDEAU, B. et al. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. **Diabetes Metab**. v. 37, n. 3, p. 245-251, 2011.
- BLONDEAU, B; BREANT, B. Effect of nutrition on fetal development: a view on the pancreatic beta-cells. In: Djelmis J, Desoye G, Ivanisevic M, editors. Diabetology of pregnancy. Basel: Karger, p. 83–93, 2005.
- BRAND, K. et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. **J Clin Invest**, v.97, p.1715–1722, 1996.
- BRASIER, A.R.; JAMALLUDIN, M.; HAN, Y.; PATTERSON, C.; RUNGE, M.S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor- κ B (NF- κ B) transcription factor, **Mol Cell Biochem**, v. 212, n. 1-2, p. 155–169, 2000.
- BRENNER, B. M. Nephron adaptation to renal injury or ablation. **Am J Physiol**, v. 249, p. F374– F389, 1985.
- BRENNER, B. M.; GARCIA, D. L.; ANDERSON, S. Glomerular and blood pressure. Less of one more the other? **Am J Hypertens**, v. 1, p. 335–347, 1988.
- BROWN, W. V.; Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. **Med Clin North Am**, v. 78, n1, p. 143-161, 1994.
- BROWNLEE, M; CERAMI, A. The biochemistry of the complication of diabetes mellitus. **Annu Rev Biochem**, v.50, p.385-432, 1981.
- BUCCIARELLI, L. G, et al. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. **Circulation**, v. 106, 2827–2835, 2002.
- BUNT, J.C.; TATARANNI, P.A.; SALBE, A.D. Intrauterine exposure to diabetes is a determinant of hemoglobin A(1)c and systolic blood pressure in pima Indian children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 6, p. 3225-3229, 2005.

CALDERARI, S. et al. Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, p. 1463–1471, 2007.

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

CALUWAERTS, S. et al. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes Mellitus? **J Soc Gynecol Investig**, v. 10, p. 216-221, 2003.

CAVANAL, M. F. et al. The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in the offspring from diabetic mothers. **Pediatr. Res.**, v. 62, p. 145-150, 2007.

CAVE, A.C. et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 5-6, p. 691-728, 2006.

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

CHEN, X. et al. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. **Am J Physiol**, v. 272, p. F299–F304, 1997.

CHUGH, S.S.; WALLNER, E.L.; KANWAR, Y.S. Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. **Semin Nephrol**, v. 23, n. 6, p. 583-592, 2003.

CODNER, E. Estrogen and type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Endocrinol Rev**, v. 6, p. 228–234, 2008.

COHEN, D.; FROGUEL, P. Higher maternal than paternal inheritance of diabetes in GK rats. **Diabetes**, v. 43, p. 220–224, 1994.

COLLART, M.A.; BAEUERLE, P.; VASSALI, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B **Mol Cell Biol** v.10, p. 1498–1506, 1990.

COLLINS, T.; MYRON, I. NF-κB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J Clin Invest**, v. 107, n.3, 2001.

COOPER, M. E.; GILBERT, R. E.; EPSTEIN, M. Patophysiology of diabetic nephropathy. **Metabolism**, v. 47, p. 3-6, 1998.

CUNHA, J.M. et al. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Braz J Med Biol Res**, v.42, p.197-206, 2009.

DABELEA, D. et al. Association of intrauterine exposure to maternal diabetes and obesity with type 2 diabetes in youth: the SEARCH Case-Control Study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1422–1426, 2008.

- DAMASCENO, D.C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Anim Reprod Sci**, v.72, p.235-242, 2002.
- DE ANGELIS, K. et al. Cardiovascular Control in Experimental Diabetes. **Braz J Med Biol Res** v. 35, n. 9, p.1091-1100, 2002.
- DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. **Auton Neurosci**. v. 145, n. 1-2, p. 3-10, 2009.
- DELARCHE, F. H. Is pancreas development abnormal in the nonobese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? **Braz j med biol res**. v. 34, p. 437-447, 2001.
- DELFINO, V. D. A. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.
- DESCAMPS-LATSCHA, B. et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v. 45, p. 39–47, 2005.
- DICKINSON, J. E. et al. Streptozocin-induced diabetes mellitus in the pregnant ewe. **Am J Obstet Gynecol**, v. 165, p. 1673–1677, 1991.
- DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). São Paulo, 3ª Ed., 2009.
- DOBLADO, M.; MOLEY, K. H. Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 14, p. 488–493, 2007.
- DOI, T. et al. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 2873–2877, 1992.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47–95, 2002.
- DRUEKE, T. et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. **Circulation**, v. 106, p. 2212–2217, 2002.
- DUONG VAN HUYEN, J. P. et al. Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. **Cell Tissue Res**, v. 314, p. 367–379, 2003.
- DUTTA, J. et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. **Oncogene**, v. 25, p. 6800–6816, 2006.
- EL AOUI, S. et al. A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (*Psammomys obesus*). **Cell Mol. Biol.**, v. 21, p. 943-953, 2007.
- EVANS, D. A. Conjoint Clinic on Drugs and Genes. **J Chronic Dis**, v.18, p.59-76,1965.

- FANG, Z. Y.; PRINS, J. B.; MARWICK, T. H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications, **Endocr Rev**, v. 25, n. 4, p. 543-567, 2004.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 43, n.1, p.1-16, 1997.
- FLETCHER, A. B. The infant of diabetic mother. In: Neonatology Pathophysiology and Management of the Newborn. Philadelphia, Lippincott, p. 287-302, 1981.
- FLYVBJERG, A. et al. Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. **Diabetes**, v. 53, p. 166-172, 2004.
- FOGLIA, V. G. et al. Fetal and placental characteristics of pregnancy in pancreatectomized rats. **Rev Soc Argent Biol**, v.43, p.187-198, 1967.
- FORBES, J. M. et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 51, p.3274-3282, 2002.
- FORBES, J. M. et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, p. 2363-2372, 2005.
- FORBES, J. M. et al. The effects of valsartan on the accumulation of circulating and renal advanced glycation end products in experimental diabetes. **Kidney Int Suppl: S105-S107**, 2004.
- FRANCO, M. C. P. et al. Intrauterine undernutrition--renal and vascular origin of hypertension. **Cardiovasc Res**, v. 60, n. 2, p. 228-234, 2003.
- FRANKEL, B. J. et al. Insulin, glucagon, and somatostatin release from the prediabetic Chinese hamster. **Diabetologia**, v. 27, p. 387-391, 1984.
- FROGUEL, P.; VELHO, G. Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. **Trends Endocrinol Metab**, v. 10, p. 142-146, 1999.
- FUJITA, T. et al. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF- κ B p50 homodimers. **Genes Dev**, v. 7, p.1354-1363, 1993.
- GARBER, A. J. Implications of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes who have abnormal lipid profiles: is lower enough? **Diabetes Obes Metab**, v. 2, p. 263-270, 2000.
- GHOSH, S.; BALTIMORE, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. **Nature**, v. 344, p. 678-682, 1990.
- GIANNOUKAKIS, N.; RUDERT, W. A.; TRUCCO, M.; ROBBINS, P. D. Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an I kappa B repressor. **J Biol Chem**, v.275, p. 36509-36513, 2000.
- GILL-RANDALL, R. et al. Type 2 diabetes mellitus – genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. **Diabetologia**, v. 47, p. 1354-1359, 2004.

- GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p.597-605, 2006.
- GRADINARU, D. et al. Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with type 2 diabetes. **J Proteomics**, v. 13, p. 181–184, 2013.
- GRAY, S.P. et al. NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. **Circulation**, v. 127, n.18, p.1888-1902, 2013.
- GROOP, P.H.; FORSBLOM, C.; THOMAS, M.C. Mechanism of disease: Pathwayselective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v.1, n.2, p.100-110, 2005.
- GUO, Z. et al. Downregulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes, and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats by N-acetyl-L-cysteine. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n.4, p. H1728-1736, 2007.
- HAFFNER, S. M. Diabetes dyslipidemia and coronary artery disease. **American J Cardiol**, v. 83, n. 9B, p. 17F-21F, 1999.
- HAKIM, Z. S.; PATEL, B. K.; GOYAL, R. K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian J Physiol Pharmacol**, v.41, n.4, p. 353-360, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press: New York, 3ed., 936p, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: University Press, 4th ed, 2007.
- HAUSBERGER, F. X.; RAMSAY, A. J. Islet hypertrophy in obesity of mice bearing ACTH-secreting tumors. **Endocrinology**, v. 65, p. 165-169, 1959.
- HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, v.132, p.344–362, 2008.
- HEARD, C. R.; TURNER, M. R. Glucose tolerance and related factors in dogs fed diets of suboptimal protein value. **Diabetes**, v.16, p. 96-107, 1967.
- HERRERA, E. et al. Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. **Diabetes**, v. 34, p. 42– 46, 1985.
- HIRANO, T. et al. Correlation of insulin deficiency and hypertriglyceridemia in diabetic rats. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 12, n. 3, p. 173-180, 1991.
- HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. **Immunol Rev**, v. 210, p. 171–186, 2006.
- HOKKE, S. N. et al. Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

- HOLEMANS, K.; AERTS, L.; VAN ASSCHE, E. A. Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 34, p. 81-85, 1991.
- HOLEMANS, K.; GERBER, R.; MEURRENS, K.; DE CLERCK, F.; POSTON, L.; VAN ASSCHE, F. A. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunctions in adult offspring. **Diabetologia**, v. 42, p. 81-89, 1999.
- HOWARTH, F.C et al. Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 4, p. 327-231, 2006.
- INOGUCHI, T. et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. S227-232, 2003.
- INTAPAD, S. et al. Sex differences in the developmental origins of cardiovascular disease. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 2, p. 122-132, 2014.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Global Guideline on Pregnancy and Diabetes. Brussels: **International Diabetes Federation**, 2009.
- IWAI, K.; TOKUNAGA, F. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B activation, **EMBO Reports**, v.10, n. 7, p. 706–713, 2009.
- JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Res**, v. 53, n.2, p.131-142, 2004.
- JANSSEN, I. et al. Overweight and obesity in Canadian adolescents and their associations with dietary habits and physical activity patterns. **J Adolesc Health**, v.35, p. 360–367, 2004.
- JANSSENS, S.; TSCHOOP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-Kb response. **Cell Death Differ**, v.13, p. 773-784, 2006.
- JANSSON, T. et al. Placental transport and metabolism in fetal overgrowth—a workshop report. **Placenta**, v. 27, p. S109 –S113, 2006.
- JAWERBAUM, A.; WHITE, V. Animal Models in Diabetes and Pregnancy. **Endoc Rev**, v. 31, n. 5, p. 680–701, 2010.
- JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENGLING, K.K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free radic Biol Med**, v.40, n.2, p.183-192, 2006.
- JONES, R.H.; OZANNE, S.E. Intra-uterine origins of type 2 diabetes. **Arch Pharmacol Res**, v. 113, n. 1, p. 25–29, 2007.
- JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest**, v. 48, p. 2129–2139, 1969.
- JUNOD, A. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med**.v. 126, n. 1, p. 201–205, 1967.

KALOUSOVA, M. et al. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. **Mutat Res Fund-Mol M**, v. 579, p. 37–46, 2005.

KALOUSOVA, M. et al. Relationship between advanced glycoxidation end products, inflammatory markers/acute-phase reactants, and some autoantibodies in chronic hemodialysis patients. **Kidney Int Suppl**, v. 84, p. 62–64, 2003.

KALOUSOVA, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiol Res**, v. 51, p. 597-604, 2002.

KALTSCHMIDT, B.; WIDERA, D.; KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF- κ B in the nervous system. **Biochem Biophys Acta** v.1745,p.287–299, 2005.

KANEDA, H. et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 162, p. 221–225, 2002.

KANETO, H. et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. **J Biol Chem**, v.277, p.30010-30018, 2002.

KARACHALIAS, N. et al. Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p.1423–1425, 2003.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Ann Rev Immunol**, v.18, p.621-663, 2000.

KATKHUDA, R. et al. Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. **Pediatr Res**, v. 72, n. 4, p. 352-61, 2012.

KAY, T. W. et al. The cell in autoimmune diabetes: many mechanisms and pathways of loss. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 11–15, 2000.

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

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

KELLER, G. et al. Nephron number in patients with primary hypertension. **N Engl J Med**, v. 348, p. 101– 108, 2003.

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

KERN, H.; LOGOTHETOPOULOS, J. Steroid diabetes in the guinea pig: studies on islet cell ultrastructure and regeneration. **Diabetes**, v. 19, p.145-151, 1970.

KING, J. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 71, p. 1218-1225, 2000.

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

KRZYSZEK-KORPACKA, M. et al. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. **Clin Biochem**, v. 41, p. 943- 949, 2008.

KTORZA, A. et al. Are animal models of diabetes relevant to the study of the genetics of non-insulin-dependent diabetes in humans? **Diabetes Metab**, v. 23, p. 38 –46, 1997.

KUMAR, A.; TAKADA, Y.; BORIEK, A. M.; Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kB: its role in health and disease. **J Mol Med**, v. 82, p. 434-448, 2004.

KUMAR, S., PRASAD, S.; SITASAWAD, S.L. Multiple antioxidants improve cardiac complications and inhibit cardiac cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. **PloS One**, v. 8, n. 7, 2013.

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

LAAKSONEN, D. E. et al. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 156, n. 11, p. 1070-1077, 2002.

LAMBETH, J. D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. **Free Radic Biol Med**, v. 43, p. 332–347, 2007.

LAMBIN, S. et al. Adipose tissue in offspring of Lepr(db/+) mice: early-life environment vs. genotype. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. E262–E271, 2007.

LANDER, H.M.; TAURAS, J.M.; OGIESTE, J.S.; HORI, O.; MOSS, R.A.; Schmidt, A.M. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. **J Biol Chem**, v. 272, p. 17810–17814, 1997.

LANGER, O.; CONWAY, D. L. Level of glycemia and perinatal outcome in pregestational diabetes. **J Matern Fetal Med**, v. 9, p. 35–41, 2000.

LAPOLLA, A.; FEDELE, D. traldi P. glyco-oxidation in diabetes and related diseases. **Clin Chim Acta**, v.357, n.2, p.236-250, 2005.

LAPPAS, M. et al. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus complicated pregnancies. **J Endocrinol**, v. 186, p. 457-465, 2005.

- LARGER, E. et al. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. **Diabetes**, v. 53, p. 752–761, 2004.
- LEE, F. T. et al. Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p. 2139–2151, 2004.
- LEITER, E. H, HERRATH, M. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. **Diabetologia**, v. 47, p. 1657-1660, 2004.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. **Diabetologia**, v. 1, p. 216–226, 2008.
- LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Rad Biol Med.**, v. 20, p. 463-466, 1996.
- LESLIE, R.D.G. et al. Level of an advanced glycated end product is genetically determined: a study of normal twins. **Diabetes**, v.52, n.9, p.2441-2444, 2003.
- LEWIS, G. F.; STEINER, G. Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev**, v.12, p. 37-56, 1996.
- LI, H. Y. et al. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 528-538, 2007.
- LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy, **J Mol Med**, vol. 86, n. 10, p. 1113–1126, 2008a.
- LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kB regulation in the immune system. **Nature Rev Immunol**, v. 2, p. 725–734, 2002.
- LI, Y. et al. Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. **J Biol Chem**, v.283, n.39, p.26771–26781, 2008b.
- LIANG, X. et al. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. **Biomarkers.**, v. 17, n. 6, p. 507-512, 2012.
- LIKE, A. A.; CHICK, W. L. Pancreatic beta cell replication induced by glucocorticoids in subhuman primates. **Am J Pathol**, v. 75, p. 329-332, 1974.
- LIM, A. K. et al. Lymphocytes promote albuminuria, but not renal dysfunction or histological damage in a mouse model of diabetic renal injury. **Diabetologia**, v. 53, p. 1772–1782, 2010.
- LIU, S. X. et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, p. 1156–1162, 2006.

- LOPEZ-SOLDADO, I.; HERRERA, E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. **Exp. Diabetes Res.**, v. 4, p. 107-118, 2003.
- LOWE, W. L. Genetics of diabetes mellitus. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, 2001.
- LU, L. et al. Effects of atorvastatin on progression of diabetic nephropathy and local RAGE and soluble RAGE expressions in rats. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 12, n. 8, p. 652-659, 2011.
- LUYCKX, V. A.; BRENNER, B. M. The Clinical Importance of Nephron Mass. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, p. 898–910, 2010.
- MACNEE, W.; RAHMAN, I. Is oxidative stress central the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? **Trends Mol Med**, v. 7, n. 55-62, 2001.
- MAGATON, A. et al. Maternal diabetes mellitus: early consequences for the offspring. **Pediatr Nephrol**, v. 22, p. 37–43, 2007.
- MAKITA, Z. et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. **N Engl J Med**, v. 325, p.836–842, 1991.
- MANÑALICH, R. et al: Relationship between birth weight, glomerular number, and glomerular size. **Kidney Intl**, v. 59, p. 770-773, 2001
- MARTIN-GALLAN, P. et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radic Biol Med**, v. 34, p.1563-1574, 2003.
- MATSUO, M.; KANEKO, T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radak Z. (ed.). Free radicals in exercise and aging. Champaign: Human Kinetics, p. 1-33, 2001.
- MATSUSAKA, T. et al. Dual renin gene targeting by Cre-mediated interchromosomal recombination. **Genomics**, v. 64, p. 127–131, 2000.
- MAZIERE, C.; MAZIERE, J.C. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 2, p. 127–137, 2009.
- MCLELLAN, K. C. P. et al. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007.
- MEFFERT, M.K.; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF- κ B. **TRENDS Neurosci**, v.28, p.27–43, 2005.
- MÉNDEZ, J. D. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. **Gac Méd Méx**, v. 139, p. 1, 2003.
- MERCURIO, F.; MANNING, A. M. NF-kappa B as a primary regulator of the stress response. **Oncogene**, v. 18, p. 6163–6171, 1999.

- MERZOUK, H. et al. Age-related changes in cholesterol metabolism in macroso mic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p. 1152-1159, 2001.
- MIN, W.; BIN, Z.W.; QUAN, Z.B.; HUI, Z.J.; SHENG, F.G. The signal transduction pathway of PKC/NF- κ B/cfos may be involved in the influence of high glucose on the cardiomyocytes of neonatal rats, **Cardiovasc Diabetol**, vol. 8, n.8, 2009.
- MOHAMED, A. K. et al. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. **BioFactors**, v. 10, p. 157-167, 1999.
- MONA SEDEEK et al. Oxidative Stress, Nox Isoforms and Complications of Diabetes—Potential Targets for Novel Therapies. **J of Cardiovasc Trans Res**, v. 5, p. 509–518, 2012.
- MONNIER, V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch Biochem Biophys**, v.419, n.1, p.1-15, 2003.
- MONNIER, V.M.; SELL, D.R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Ann NY Acad Sci**, v. 1043, p.567-581, 2005.
- MORAN, T. H; BI, S. Hyperphagia and obesity of OLETF rats lacking CCK1 receptors: developmental aspects. **Dev Psychobiol**, v. 48, n. 5, p. 360-367, 2006.
- MORCOS, M. et al. Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 51, p. 3532–3544, 2002.
- MORITZ, K. M. et al. Uteroplacental insufficiency causes a nephron deficit, modest renal insufficiency but no hypertension with ageing in female rats. **J Physiol**, v. 587, p. 2635–2646, 2009.
- MURATA, M. et al. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. **Biochem Pharmacol**. v. 57, n. 8, p. 881-887, 1999.
- NABEL, G.; BALTIMORE, D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. **Nature**, v.326, p.711–713,1987.
- NAKANO, H. et al. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. **Cell Death Differ**, v. 13, p. 730–737, 2006.
- NAKHOODA, A. F. et al. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. **Diabetes**, v. 26, p. 100–112, 1977.
- NANDI, A. et al. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1863–1871, 2010.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP (NDDG). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v. 28, p. 1039-1057, 1979.
- NEHIRI, T. et al. Exposure to Maternal Diabetes Induces Salt-Sensitive Hypertension and Impairs Renal Function in Adult Rat Offspring. **Diabetes**, v. 57, 2008.

- NIELSEN, K.K. et al. From screening to postpartum follow-up - the determinants and barriers for gestational diabetes mellitus (GDM) services, a systematic review. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 22, 2014.
- NIEUWENHUIZEN, A.G. et al. Role of increased insulin demand in the adaptation of the endocrine pancreas to pregnancy. *Acta Physiol Scand*, v. 159, p. 303–312, 1997.
- NISHIO, Y. et al. Altered activities of transcription factors and their related gene expression in cardiac tissues of diabetic rats. **Diabetes**, v. 47, p. 1318–1325, 1998.
- NOBRE, F.; SERRANO, C. V. J. Tratado de cardiologia SOCESP. São Paulo: Manole, p. 1856, 2005.
- NOLD, J.L; GEORGIEFF, M.K. Infants of diabetic mothers. **Pediatr. Clin. North Am**, v. 51, n. 3, p. 619-637, 2004.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- OLIVEIRA V. L. L. et al. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rate with streptozotocin-induced diabetes treated with insulin. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, p. 1081-1086, 1997.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Icdh-2: Internacional classification of functioning and disability. Geneva: Organização Mundial de Saúde; 1999.
- ORNOY, A. et al. The Cohen diabetic rat as a model for fetal growth restriction: vitamins CandE reduce fetal oxidative stress but do not restore normal growth. **Reprod Toxicol**, v. 28, p. 521–529, 2009.
- PARAVACINI, T.M. et al. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. **Circ Res**, v. 91, n. 1, 54-61 2002.
- PARIS, A. S.; SERRANO, M. A. S.; GAMBOA, R. A. Lipid metabolism and new diabetic recommendations. **An Med Interna**. v. 13, n.3, p. 136-145, 1996.
- PATEL, S.; SANTANI, D. Role of NF-kappa B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 4, p. 595-603, 2009.
- PATLAS, N. et al. Pregnancy outcome in the *Psammomys obesus* gerbil on low and high-energy diets. **Biol Neonate**, v. 90, p. 58–65, 2006.
- PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin Diabetes**, v.21, n.4, p.186-7, 2003.
- PERKINS, N. D.; GILMORE, T. D. Good cop, bad cop: The different faces of NF-kappa B. **Cell Death Differ** 13: 759–772, 2006.

- PESCE, C. M. et al. Glomerular size and the incidence of renal disease in African Americans and Caucasian. **J Nephrol**, v. 7, p. 296–301, 1994.
- PETTITT, D.J. et al. Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **N Eng J Med**, v. 308, n. 5, p. 242–5, 1983.
- PINNEY, S.E.; SIMMONS, R.A. Metabolic programming, epigenetics and gestational diabetes mellitus. **Curr Diab Rep**, v. 12, n. 1, p. 67-74, 2012.
- PIWOWAR, A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. **Pol Merkuriusz Lek**, p. 28, v. 166-9, 2010.
- PLANAVILA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes, **Cardiovasc Res**, v. 65, n. 4, p. 832–841, 2005.
- PORTO, N.P. et al. Effects of K^+ channels inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, v. 118, n. 6, p. 360-363, 2010.
- RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep**, v.29, p.91-8, 1963.
- RAMIREZ-GARCIA, S. A. et al. Implications in primary health care of medical genetics and genomic in type 2 diabetes mellitus. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc.**, v. 51, n. 3, p. 6-26, 2013.
- RAMOS-ALVES, F.E. et al. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **Br J Pharmacol.**, v. 166, n. 7; p. 2198-2208, 2012.
- RAMOS-ALVES, F. E. et al. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. **PLoSOne**. v. 7, n. 11, 2012.
- RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; LEWIS, G.F. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemia states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clin Biochem**, v. 36, p. 421-429, 2003.
- RAZA, H.; JOHN, A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 20, n. 1, p. 72-78, 2004.
- REDDY, M.A.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. **Cardiovasc Res**, v. 90, p. 421–429, 2011.
- REID, P. M. Animals models of diabetes Mellitus: a review. **Lab Animals**, v. 26, p. 40-45, 1981.
- REIS, A. F. et al. Mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol**, v.143, p. 511-513, 2000.

RERUP, C; TARDING, F. Streptozotocin- and alloxan-diabetes in mice. **Eur J Pharmacol.** v. 7, n. 1, p. 89-96, 1969.

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

RUDGE, M.V. et al. Histopathological placental lesions in mild gestational hyperglycemic and diabetic woman. **D&MS**, v. 10, n. 3, p. 19, 2011.

RUDOLPH, D.; YEH, W.C.; WAKEHAM, A. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*, v. 14, n.7, p. 854-862, 2000.

RYAN, E. A. et al. Long term consequences in offspring of diabetes in pregnancy: studies with syngeneic islet-transplanted streptozotocin-diabetic rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5587–5592, 1995.

SANTOS, D. R. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 77, n.3, p. 1-48, 2001.

SANTOS, R. D. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevencao da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, Sao Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066782X2001001500001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em:24 abr. 2012.

SCHAAN, B. D. et al. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Braz J Med Biol Res.** v 37, n. 12, p. 1895-1902, 2004.

SCHAAN, B. et al. Increased renal GLUT 1 abundance, albuminuria and urinary TGF-beta1 in STZ-induced diabetic rats: implications for the development of diabetic nephropathy (DN). **Horm Metab Res**, v. 33, p. 1-6, 2001.

SCHMIDT, A. M. et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associates with diabetes. **J Periodont Res**, v.31, p.508-515, 1996.

SCHMIDT, A.M. et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **J Clin Invest.**, v. 108, p. 949–955, 2001.

SCHORLEMMER, A.; MATTER, M.L.; SHOHET, R.V. Cardioprotective signaling by endothelin, **Trends Cardiovasc Med**, v. 18, n. 7, p. 233–239, 2008.

SEGAR, E.M. et al. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. **Clin Sci (Lond).** v. 117, n. 3, p. 129-138, 2009.

SELJELFLOT, I.; AASE, O.; EID, H. Levels of oxidative stress are associated with C-reactive protein levels in patients with stable and unstable angina. **Europ Heart J**, v. 4, p. 298–306, 2002.

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. **J Physiol**, v. 1, n. 589, p. 7-20, 2011.

SHAFRIR, E.; BARASH, V. Placental function in maternalfetal fat transport in diabetes. **Biol Neonate**, v. 51, p. 102–112, 1987.

SHI, X. Y. et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Endocrinology**, v. 149, p. 1829-1839, 2008.

SMALE, S.T. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. **Nat Immunol** v.12, p. 689-694, 2011.

SONKA, K. et al. Advanced oxidation protein products in obstructive sleep apnea. **Prague Med Rep.**, v. 109, n. 2, p.159-65, 2008.

SRIVASTAVA, S.K.; RAMANA, K.V. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. **Exp Eye Res**, v. 88, p. 2-3, 2009.

STARKEY, J. M, et al. Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. **Diabetes**, v. 55, p. 1252–1259, 2006.

STEINER, G. Treating lipid abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v. 88, p. 37N-40N, 2001.

STEWART, M. W.; LAKER, M. F.; ALBERTI, K. G. The contribution of lipids to coronary heart disease in diabetes mellitus. **J Intern Med Suppl**, v. 736, p. 41-46, 1994.

STOCKER, R.; KEANEY JR, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol.**, v. 84, n. 4, p.1381-1478, 2004.

TAK, P.P.; FIRESTEIN, G.S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest** v. 107,p.7-11, 2001.

TAMARAT, R. et al. Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n.14, 2003.

TANGI, N. et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. **J Am Soc Nephrol**, v.11, p.1656-1666, 2000.

TANNUS, L. R. M. et al. Diabetes mellitus do tipo 1A na primeira infância de gêmeos dizigóticos: associação entre fatores genéticos e ambientais. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 1, 2007.

THORNALLEY, P.J. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. **Biochem Soc trans**, v.6, p.1341-1342, 2003.

TRAN, S. et al. Maternal Diabetes Modulates Renal Morphogenesis in Offspring. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n. 5, p. 943–952, 2008.

URIBARRI, J. et al. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. 728–731, 2003.

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

VAN DEN OUWELAND, J. M. W. et al. Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD) is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene. **Diabetes**, v. 43, p. 746-751, 1994.

VELHO, G.; BELLANNÉ-CHANTELOT, C.; TIMSIT, J. MODY, a model of genotype/phenotype interactions in type 2 diabetes. **Med Sci (Paris)**, v. 19, n. 8-9, p. 854-9, 2003.

VLASSARA, H. et al. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 91, n. 24, p. 11704-11708, 1994.

VLASSARA, H.; PALACE, M.R. Diabetes and advanced glycation end products. **J Intern Med**, v. 251, p. 87–101, 2002.

WEI, X.F. et al. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, n. 2, p. F427-437, 2009.

WEST, N.A. et al. Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. **Diabetologia**, v. 54, n. 3, p. 504-507, 2011.

WICHI, R. B. et al. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. **Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol**, v. 288, p. 1129-1133, 2005.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLER-BLANDIN, C. AOPP as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, p. 1304–1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V.; GAUSSON, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? **Kidney Int Suppl**, v. 84, p. 11–14, 2003.

XIAO, G.; Harhaj, E.W.; Sun S.C. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. **Mol Cell** v.7, p. 401-409, 2001.

XUE, X. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. **J Biol Chem**, v. 280, p. 33917–33925, 2005.

YAMAOKA, S. et al. Complementation cloning of *NEMO*, a component of the I κ B kinase complex essential for *NF- κ B* activation. **Cell**, v. 93, p.1231–1240, 1998.

YANG, H.; WRIGHT, J.R. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. **Endocrinology**, v.143, p.2491-2495, 2002.

YOSHIOKA, M. et al. A novel locus, *Mody4*, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. **Diabetes** v. 46, p. 887–894, 1997.

ZHENG, F. et al. Lyzosome enhances renal excretion of advanced glycation endproducts in vivo and suppresses adverse age-mediated cellular effects in vitro: a potential AGE sequestration therapy for diabetic nephropathy? **Mol Med**, v. 7, n. 11, p. 737-747, 2001.

ZHOU, Q. G. et al. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. **Cell Physiol Biochem**, v. 26, n. 4, p. 775-86, 2010.

5. **ARTIGO:** a ser submetido à revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia”

1 **Exposição intauterina ao diabetes aumenta a expressão de NF- κ B e de**
2 **marcadores do estresse oxidativo**

3
4
5
6 Geórgia Maria Ricardo Félix dos Santos¹; Maria Luiza Morais Barreto de Chaves²; Cristina de Oliveira Silva³
7 Glória Isolina Boente Pinto Duarte¹
8
9

10 ¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Recife, PE, Brasil.

11
12 ² Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, São Paulo,
13 SP, Brasil.

14
15 ³ Universidade Federal de Pernambuco/ Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV), Núcleo de Nutrição, Recife,
16 PE, Brasil.

17
18 Correspondência para: Glória Isolina Boente Pinto Duarte, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária,
19 Recife – PE, Brasil, CEP: 50670-901, Fone PABX: (81) 2126.8000 / Fax: (81) 2126.8029,
20 duarte.gloria@gmail.com
21

22 **Palavras-chave:** diabetes gestacional; estreptozotocina; produtos finais de glicação avançada; ratos Wistar

23
24 Número de palavras: 2.501

25 Número de figuras e tabelas: 6

26 Tipo de manuscrito: artigo original
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

61 **Resumo**

62

63 **Objetivos:** Analisar as alterações produzidas pelo diabetes gestacional sobre os produtos finais de glicação
64 avançada (AGEs), os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), a expressão proteica do fator de
65 transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e expressão gênica da interleucina-1beta (IL-1 β) e da NADPH oxidase 4
66 (Nox4) em aortas da prole adulta.

67 **Métodos:** Ratas Wistar (230-250g), receberam uma dose única de estreptozotocina (42 mg/kg, intraperitoneal)
68 no 7º dia de gestação. Controles receberam apenas o veículo. A prole foi dividida em dois grupos: controle, não
69 diabético (ND) e diabetes gestacional (DG). AGEs e AOPP, foram mensurados no plasma por fluorescência e
70 espectrofotometria, respectivamente. A peroxidação lipídica foi avaliada pela dosagem das substâncias reativas
71 ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado. A expressão proteica de NF- κ B foi analisada por Western blot e a
72 expressão gênica de IL-1 β e de Nox4 por qRT-PCR, em aortas. Nos rins, foi contabilizado o número de néfrons.

73 **Resultados:** AGEs, AOPP e TBARS foram mais elevados no grupo DG do que no ND. A expressão proteica de
74 NF- κ B foi 1,4 vezes maior no grupo exposto ao DG. A expressão gênica de IL-1 β e Nox4 foram mais elevadas
75 no grupo DG.

76 **Conclusão:** O estresse oxidativo plasmático e tecidual associado ao aumento da expressão proteica do NF- κ B e
77 de IL-1 β na prole adulta, são marcadores importantes da inflamação que podem estar associados a disfunção
78 endotelial e macroangiopatia diabética, podendo contribuir para o desencadeamento do processo aterosclerótico.
79 Esses achados corroboram a hipótese de programação fetal.

80

81 **Palavras-chave:** diabetes gestacional; estreptozotocina; produtos finais de glicação avançada; ratos Wistar

82

83

84

85 **Introdução**

86

87 Estudos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos sustentam a hipótese da “programação fetal”, que
88 sugere que distúrbios ocorridos durante o desenvolvimento fetal podem determinar alterações permanentes na
89 fisiologia e/ou morfologia de órgãos e tecidos na idade adulta. O conceito de “programação fetal” é utilizado
90 como base para o conhecimento da origem de algumas doenças cardiovasculares (1), como a aterosclerose
91 diabética (2).

92 A hiperglicemia é o principal fator envolvido nas complicações vasculares do diabetes. Evidências
93 experimentais indicam que o coração do feto é um dos órgãos mais afetados e que 40 a 50% de defeitos
94 congênitos estão localizados no sistema cardiovascular (3). Hiperglicemia persistente aumenta a formação dos
95 produtos finais de glicação avançada (AGEs). Seus efeitos deletérios em diferentes tecidos, são atribuídos às
96 suas ações químicas, inflamatórias e pró-oxidantes. As atividades biológicas dos AGEs são exercidas por
97 mecanismos diferentes. O primeiro é independente do receptor e promove dano a estrutura das proteínas e da
98 matriz extracelular. O segundo, envolve a ligação a receptores específicos, como o receptor RAGE (receptor
99 para produtos finais de glicação avançada) (4). A interação AGEs - RAGE desencadeia a ativação de proteínas
100 quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-K), vias que conduzem à
101 ativação do fator de transcrição NF- κ B. Após ser ativado, esse fator transloca-se para o núcleo e promove a
102 transcrição de numerosos genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, como a interleucina-6 (IL-6) e a

103 interleucina-1 beta (IL-1 β), fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e a óxido nítrico sintase. A
104 ativação do NF- κ B aumenta a expressão de RAGE, criando um feedback positivo para a produção dos fatores
105 inflamatórios (5). Salienta-se, que durante algumas das reações que levam à formação de AGEs, as espécies
106 reativas de oxigênio (ROS) são geradas e concorrem paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos
107 estruturais e funcionais às células.

108 Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) são considerados como marcadores patogênicos
109 renais e do dano oxidativo mediado por proteínas (6). O acúmulo de AOPP foi encontrado em pacientes
110 diabéticos com alterações macrovasculares (7). Todavia, o sistema NADPH (nicotinamida
111 adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase é a principal fonte da produção de ROS em células vasculares (8). Os
112 principais componentes do complexo enzimático da NADPH oxidase, Nox1e Nox4, são expressos nestas células
113 e estão aumentados durante o processo de remodelamento vascular que acompanha a aterosclerose diabética. A
114 disfunção endotelial relaciona-se com o aumento da atividade da NADPH oxidase através da expressão de suas
115 subunidades catalíticas. Lesões ateroscleróticas em artérias coronárias humanas mostram um aumento da
116 expressão de subunidades da NADPH oxidase na região vulnerável da placa. Aumento da Nox4 foi observado
117 durante a fase de formação do ateroma, todavia sua expressão é reduzida em lesões avançadas (9).

118 Neste estudo foi investigado a influência da exposição intra-uterina ao diabetes sobre a expressão
119 protéica do NF- κ B, dos marcadores do estresse oxidativo e da IL-1 β em aortas da prole adulta

120

121 **Materiais e Métodos**

122

123 **Animais**

124 Foram utilizados ratos Wistar, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia
125 da Universidade Federal do Pernambuco, mantidos à temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro
126 padrão (12 horas claro/12 horas escuro), água e ração *ad libitum*. Os protocolos foram realizados obedecendo as
127 normas preconizadas “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo “US National Institute
128 of Health” (NIH publicações 85-23, revisado em 1996) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação
129 Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo 23076.037553/2010-10).

130 Ratas Wistar com 3 meses de idade (230 a 250g), nulíparas, receberam uma dose (42 mg/kg) única de
131 estreptozotocina no 7º dia de gestação (STZ, Sigma, St Louis, MO) via intra peritoneal (i.p.), dissolvida em
132 tampão citrato trissódico 0,01 M (pH 4,5). Fêmeas controles receberam apenas o veículo. Os níveis de glicose

133 foram estimados através de glicosímetro (Optium mini[®]) no 3^o, 5^o e 14^o dia após a administração de STZ. Após o
134 desmame, as proles foram divididas em dois grupos: grupo controle (ND) e grupo diabetes gestacional (DG).
135 Aos quatro meses de vida, amostras de sangue de ambas as proles foram obtidas pelo plexo retro-orbital,
136 centrifugadas a 4.000 r.p.m. durante 15 min, a 4 °C, determinando-se os níveis de glicose, colesterol total (CT),
137 HDL-colesterol (HDL-c) e triglicérides (TG) através de kits enzimáticos específicos (Labtest[®]).

138

139 **Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)**

140

141 A concentração plasmática de AOPP foi determinada por espectrofotometria (6) utilizando 50 µl de
142 plasma. Uma curva padrão foi estabelecida através de uma mistura de cloramina T, iodo de potássio e ácido
143 acético, permitindo quantificar AOPP presentes em µmoles/L de equivalentes de cloramina T.

144

145 **Determinação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)**

146

147 A concentração de AGEs, foi determinada no plasma (1/50) por fluorescência (10). Os dados foram
148 expressos como unidades arbitrárias.

149

150 **Análise de Western blot**

151

152 A expressão do NF-κB foi determinada através de *Western Blot*. Os animais foram eutanaziados por
153 decapitação em guilhotina. Após toracotomia, a aorta torácica foi retirada e homogeneizada em tampão de lise
154 RIPA e centrifugada a 12.000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. A concentração proteica foi medida no sobrenadante
155 pelo método de Bradford (1976). Após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), as proteínas
156 foram transferidas para uma membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF) (Immobilon, Millipore, Molsheim,
157 França) em aparelho de transferência (Bio Rad) a 4°C. Em seguida, a membrana foi colocada em solução de
158 bloqueio (5% de leite em pó desnatado em TBS-Tween) durante 1,5 h à temperatura ambiente e incubada com
159 anticorpo primário específico para NF-κB p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) na
160 diluição 1:1000, por 12h a 4 °C. Após a lavagem (TBS), as membranas foram incubadas durante uma hora e
161 meia com o anticorpo secundário (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Bar Harbor, ME, USA) na
162 diluição de 1:1500. Algumas membranas foram usadas para determinação da expressão da α-actina (Sigma

163 Chemical Ca, St. Louis, MO, USA). A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência, utilizando
164 o kit comercial ECL (ECL, Amersham Biosciences Europe GmbH, Orsay, França). As bandas foram
165 quantificadas por densitometria, utilizando o programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation,
166 Frederick, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

167

168 **Análise da expressão gênica**

169

170 O RNA total das aortas da prole oriunda de mães diabéticas e controles foram isolados através da
171 homogeneização do tecido com o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA), de acordo com as instruções do
172 fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com MMLV RT (Life Technologies) a partir de 1
173 micrograma de RNA total em um volume total de 20 microlitros com um primer oligo (dT). A PCR em tempo
174 real (qRT-PCR) foi realizada em um termociclador (Corbett Research, Sydney, Austrália), utilizando o SYBR
175 Green PCR Master Mix (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram
176 corridas em duplicata e os dados de PCR em tempo real foram normalizados para β -actina. As seguintes
177 seqüências dos primers foram utilizadas para a IL-1 β : 5'-AGG CAC TCT TCG AAG GCA C-3' e 5'-CAG AGG
178 TCC AGG TCCTGG AA -3', para Nox4: 5'- TAG CTG CCC ACT TGG ACG-3' e 5'-TGT AAC CAT GAG
179 GAA CAA TAC CAC C-3', enquanto que para β -actina foram: 5'-GTC AGG TCA TCA CTA TCG GCA AT-3'
180 e 5'-TCA CAC GAC CTC ATC TGT CAC-3'.

181

182 **Avaliação da peroxidação lipídica**

183

184 A medida dos níveis de peroxidação lipídica foi avaliada pela dosagem das substâncias reativas ao ácido
185 tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído (MDA) segundo Ohkawa modificado (11). Para cada 1g de
186 tecido hepático foi adicionado, 5 ml de KCl-EDTA 1,15% e homogeneizado por 30 segundos. A seguir, 50 μ L,
187 foram transferidos para um tubo contendo 950 μ L da solução de TBA 0,8%, SDS 8,1%, ácido acético 20% e
188 água, incubando-se em banho maria, a 95 °C, por 60 minutos. Posteriormente, os tubos foram imediatamente
189 resfriados em recipiente contendo gelo para bloquear a reação. Foram adicionados 0,25 ml de água destilada e
190 1,25ml de n-butanol, homogeneizando-se no vórtex por mais 30 segundos. Os tubos foram centrifugados por 10
191 minutos a 4.000 r.p.m. e a leitura da fase orgânica foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de
192 532nm. Os resultados foram expressos em η mol MDA/mg de proteína.

193 **Quantificação do número de néfrons**

194

195 A quantificação do número de néfrons foi realizada conforme o método de Bertram (12).

196

197 **Análise estatística**

198

199 Todos os resultados foram expressos em variações médias \pm erro padrão da média (e.p.m). Foram
200 utilizados o teste t de Student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

201

202 **Resultados**

203

204 **Parâmetros bioquímicos**

205 Aos quatro meses de idade, a prole DG apresentou um aumento nos níveis de glicose ($p < 0,001$),
206 colesterol total e triglicerídeos ($p < 0,05$), quando comparados a ND (Tabela 1).

207 Para evitar a possibilidade de rejeição, os animais oriundos de fêmeas diabéticas foram pesados ao 2º dia
208 de nascimento, observando-se que seu peso corporal foi maior ($p > 0,05$) quando comparado a ND ($7.3 \pm 0.24g$
209 vs. $6.9 \pm 0.094g$, $n=13$, respectivamente).

210

211 **Biomarcadores de estresse oxidativo**

212

213 Os marcadores do estresse oxidativo são mostrados na Tabela 2. Na prole DG, níveis elevados de
214 AGEs, ($p < 0,01$) AOPP e TBARS ($p < 0,05$) em comparação a ND.

215

216 **Expressão protéica do NF- κ B**

217

218 Os níveis plasmáticos elevados de AOPP e AGEs, observados na prole DG, conduziram a investigação
219 da expressão protéica do NF- κ B em aortas, verificando-se que este encontra-se 1,4 vezes aumentado no grupo
220 DG (Figura 1).

221

222 **Expressão gênica da IL-1 β e da Nox4**

223

224 A expressão gênica da IL-1 β e da Nox4 nas aortas do grupo DG e ND foram avaliadas por qRT-PCR.
225 Os níveis da IL-1 β foram significativamente elevados ($p < 0,05$) no grupo DG ($2,61 \pm 0,56$ vs. $1,0 \pm 0,0$ ND),
226 bem como os níveis da Nox4 ($1,60 \pm 0,0$ vs. $1,00 \pm 0,0$ ND) (Figuras 2 e 3).

227

228 **Quantificação do número de néfrons**

229

230 Neste modelo, nós podemos observar que a exposição ao diabetes na fase intra-uterina comprometeu o
231 número de néfrons que foi reduzido em 30% na prole adulta (Figura 4).

232

233 **Discussão**

234

235 O estresse oxidativo, a disfunção endotelial e a inflamação desempenham um papel central na
236 patogênese da aterosclerose diabética (13). Todavia, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste
237 processo ainda não estão completamente elucidados. No presente estudo foi demonstrado um aumento dos
238 fatores pró-inflamatórios na aorta, que foi associado ao estresse oxidativo plasmático e tecidual, corroborando
239 estudos anteriores de nosso laboratório que mostram uma “up regulation” da COX-2 em artérias de resistência
240 oriundas de prole diabética que contribuem para disfunção endotelial (14).

241

242 O aumento nos níveis de triglicerídeos encontrado na prole diabética corrobora os achados de outros
243 autores (15, 16). Os lipídios são indicados como um dos principais marcadores patogênicos, em situações de
244 disfunção metabólica e de peroxidação lipídica (17). AGEs, AOPP e TBARS modificam proteínas ou lipídeos
245 sanguíneos, os quais podem ligar-se a receptores específicos, causando a produção de citocinas inflamatórias e
246 fatores de crescimento, contribuindo para as complicações do diabetes. Níveis elevados de AOPP foram
247 encontrados no pâncreas (18). Foi também relatado a presença de AGEs e AOPP em várias estruturas renais e
248 placas ateromatosas (19). Alguns estudos referenciam aumentos nos níveis séricos de AGEs e AOPP em
249 pacientes com DM-2 (20, 21) como fatores de risco para o desenvolvimentos das complicações vasculares. Os
250 níveis plasmáticos elevados de AGEs e AOPP corroboram os resultados encontrados por estes autores (19, 20,
251 21).

251

252 No presente estudo, a redução de néfrons encontrada na prole diabética pode contribuir para a
hipertensão encontrada em estudos anteriores (22) e maior suscetibilidade à doença renal diabética. Esses

253 resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (23,24). Adicionalmente, Ramos-Alves e cols.
254 (14,22) demonstraram que a exposição intra-uterina a hiperglicemia a expressão protéica da ciclo-oxigenase-2
255 (COX-2) em artérias mesentéricas da prole aos 3, 6, 12 meses de idade pode aumentar a resposta contrátil em
256 vasos de resistência, contribuindo para a hipertensão. Sabendo-se, que o NF- κ B poderia regular a expressão da
257 COX-2 através da participação de prostanóides, fica claro a participação de um estímulo inflamatório, o qual
258 poderia estar associado com o desenvolvimento de lesões vasculares, ilustrando a complexidade da via de
259 sinalização intracelular do NF- κ B. Isto deve-se, aos variados estímulos que o ativam, bem como aos inúmeros
260 genes e fenômenos regulados pelo NF- κ B, como o aumento da liberação das citocinas pró-inflamatórias
261 envolvidas na aterosclerose, como por exemplo, a IL-1 β (25)

262 Ao nosso conhecimento é a primeira vez que esta sendo demonstrado que ratos expostos a níveis
263 elevados de glicose na fase intra-uterina apresentam aumento significativo da expressão proteica de NF- κ B em
264 aorta, quando adultos. É bem conhecido que o NF- κ B tem um papel essencial no estabelecimento do diabetes e
265 suas complicações, especialmente no diabetes tipo I (26). Zhixin Guo e cols. (27) demonstraram que o NF- κ B
266 estava aumentado em aortas de ratos submetidos a dieta hiperlipídica, embora outros autores tenham observado
267 uma redução do inibidor do NF- κ B, o I κ B- α , sem que ocorrido aumento desse marcador, em camundongos
268 obesos (28).

269 Os níveis elevados da expressão proteica de NF- κ B, geralmente estão relacionados a interação AGEs-
270 RAGE, entretanto um aumento na sua expressão constitutiva também poderia ocorrer (29). Mas, os resultados
271 obtidos no presente estudo, não nos permite afirmar se o aumento da expressão protéica de NF- κ B em aortas da
272 prole DG é constitutivo, todavia sugerem que este aumento é, pelo menos em parte, relacionado com a
273 capacidade de resposta das células do músculo liso vascular da aorta à estimulação por AGEs. Em ratos
274 espontaneamente hipertensos foi mostrado que a atividade do NF- κ B, nas primeiras semanas de vida, associado
275 ao estresse oxidativo poderia levar ao desenvolvimento de hipertensão.

276 É relatado em estudos *in vivo* e *in vitro* o papel da IL-1 β como agonista primário da apoptose de células
277 beta em pacientes com DM-2, sugerindo que a IL-1 β parece mediar o processo autoinflamatório (30). Em
278 adição, a IL-1 β por sua vez, pode ativar o NF- κ B, e estimular a produção de ROS e de outras citocinas (31).
279 Doses elevada de STZ (125 mg/kg) injetas em porquinho chinês levou a um aumento de IL-1 β , TNF- α e IL-6
280 (32). Esses resultados corroboram os achados em ratos da linhagem Wistar submetidos a três doses diárias de 30
281 mg/kg de STZ (33) e aos achados do presente estudo. Ademais, aqui foi encontrado um aumento da expressão
282 gênica da Nox4 através de qRT-PCR no grupo DG. Este achado tem grande relevância, visto que ao contrário

283 das outras subunidades da NADPH-oxidase, a Nox4 funciona independentemente da presença de subunidades
284 citosólicas (34). A Nox4 medeia a resposta proliferativa em células endoteliais (35). Desta forma, o estresse
285 oxidativo plasmático e tecidual presente na prole DG parece aumentar a expressão proteica de NF- κ B e a
286 expressão gênica da IL-1 β , sugerindo que o ambiente fetal poderia ser capaz de programar alterações vasculares
287 na prole oriunda de mães diabéticas.

288

289 **Agradecimentos:** Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Conselho Nacional
290 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
291 Superior (CAPES).

292 **Declaração:** os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

293

294 **Referências**

295

- 296 1. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171-4
- 297 2. Simeoni U, Barker DJ. Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. *Semin Fetal Neonatal*
298 *Med.* 2009;14(2):119-24.
- 299 3. Zielinsky P, Marcantonio S, Nicoloso LH, Luchese S, Hatem D, Scheid M, Mânica JL, Gus EI, Satler
300 F, Piccoli AL Jr. Ductus venosus flow and myocardial hypertrophy in fetuses of diabetic mothers. *Arq*
301 *Bras Cardiol.* 2004; 83(1):51-6; 45-50.
- 302 4. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to
303 clinical implications. *Atherosclerosis.* 2008; 196(1):9-21.
- 304 5. Chen P, Zhao J, Gregersen H. Up-regulated expression of advanced glycation end-products and their
305 receptor in the small intestine and colon of diabetic rats. 2012; *57(1):48-57.*
- 306 6. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup
307 S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel
308 mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998;
309 161(5):2524-32.
- 310 7. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C. Biomarkers of diabetes-associated
311 oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical
312 complications. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(12):1563-74.

- 313 8. Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. Free
314 Radic Biol Med. 2007;43(3):332-47.
- 315 9. Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX Who is There? The Contribution of NADPH Oxidase One to Beta
316 Cell Dysfunction. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;4:40. doi:
- 317 10. Muench G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, et al. Determination of advanced
318 glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. Eur J Clin
319 Chem Clin Biochem. 1997;35:669-677
- 320 11. Ohkawa H, Ohishi I, Yagi E. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction;
321 Anal. Biochem. 1979; 95:351-8.
- 322 12. Bertram, JF. Counting in the kidney. Kidney Int 2001; 59(2):792-796.
- 323 13. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, et al. The relationships between
324 post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with
325 type 2 diabetes. Atherosclerosis 2001;154:475-83.
- 326 14. Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE Effect of age and COX-2-
327 derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. Br
328 J Pharmacol. 2012;166(7):2198-208
- 329 15. López-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in
330 pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. Exp Diabetes Res. 2003;4(2):107-18.
- 331 16. Porto NP, Jucá DM, Lahlou S, Coelho-de-Souza AN, Duarte GP, Magalhães PJ. Effects of K⁺channels
332 inhibitors on the cholinergic relaxation of the isolated aorta of adult offspring rats exposed to maternal
333 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2010;118(6):360-3.
- 334 17. Lüscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology,
335 clinical consequences, and medical therapy: Part II. Circulation. 2003 Sep 30;108(13):1655-61.
- 336 18. Ardestani A, Yazdanparast R, Jamshidi Sh. Therapeutic effects of Teucrium polium extract on oxidative
337 stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. J Med Food. 2008 Sep;11(3):525-32.
- 338 19. Stitt AW, Bucala R, Vlassara H: Atherogenesis and advanced glycation: Promotion, progression, and
339 prevention. Ann N Y Acad Sci 811: 115-127, 1997.
- 340 20. Bansal S, Chawla D, Siddarth M, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. A study on serum advanced
341 glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2
342 diabetic patients with vascular complications. Clin Biochem. 2013 Jan;46(1-2):109-14.

- 343 21. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, Uzun H. Oxidative lipid, protein,
344 and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest*
345 *Med.* 2011;34(3):E163-71.
- 346 22. Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE.
347 Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in
348 mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One.* 2012;7(11):e50593.
- 349 23. Amri K, Freund N, Vilar J, Merlet-Bénichou C, Lelièvre-Pégorier M. Adverse effects of hyperglycemia
350 on kidney development in rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Diabetes.* 1999;48:2240–2245.
- 351 24. Tran S, Chen YW, Chenier I, Chan JS, Quaggin S, Hébert MJ, et al. Maternal diabetes modulates renal
352 morphogenesis in offspring. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(5):943-52.
- 353 25. Myers GL, Rifai N, Tracy RP, Roberts WL, Alexander RW, Biasucci LM, Catravas JD, Cole
354 TG, Cooper GR, Khan BV, Kimberly MM, Stein EA, Taubert KA, Warnick GR, Waymack
355 PP; CDC; AHA. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease:
356 Application to Clinical and Public Health Practice: report from the laboratory science discussion group.
357 *Circulation.* 2004;110(25):e545-9.
- 358 26. Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng S, Tisch RM, Chen YH. Critical roles of tumor necrosis factor-related
359 apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(9):2274-8.
- 360 27. Guo Z, Zhang R, Li J, Xu G. Effect of telmisartan on the expression of adiponectin receptors and
361 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the heart and aorta in type 2 diabetic rats.
362 *Cardiovasc Diabetol.* 2012 Aug 8;11:94.
- 363 28. Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV. Oxidative stress and
364 inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J*
365 *Hypertens.* 2010;28(10):2111-9.
- 366 29. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles
367 in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(3):235-47.
- 368 30. Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of
369 the septic shock syndrome. *J Infect Dis.* 1991;163(6):1177-84.
- 370 31. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the
371 expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5657-67.

- 372 32. Lu L, Zhang Q, Pu LJ, Xu XW, Zhang RY, Zhang JS, Hu J, Yang ZK, Lü AK, Ding FH, Shen J, Chen
373 QJ, Lou S, Fang DH, Shen WF. Elevation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and
374 interleukin-6 levels in aortic intima of Chinese Guizhou minipigs with streptozotocin-induced diabetes.
375 *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(6):479-84.
- 376 33. Sotnikova R, Okruhlicova L, Vlkovicova J, Navarova J, Gajdacova B, Pivackova L, Fialova S, Krenek
377 P. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *J*
378 *Pharm Pharmacol*. 2013;65(5):713-23.
- 379 34. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. Nox4 NAD(P)H
380 oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol*
381 *Chem*. 2005;280(47):39616-26.
- 382 35. Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, Kietzmann T, Hess J, Görlach A. NOX2 and NOX4 mediate
383 proliferative response in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1473-84.

Tabela 1 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos das proles adultas de animais expostos ao diabetes, induzido por estreptozotocina (42 mg/kg i.p.) no período intra-uterino e controles não diabéticos (ND)

	Grupos	
	ND	DG
Glicose (mg/dL)	88,0 ± 1.9	120,0 ± 2.4***
Triglicédeos (mg/dL)	42,0 ± 1.5	54,0 ± 3.0*
Colesterol total (mg/dL)	71,0 ± 6.3	94.5 ± 2.2*
Colesterol HDL (mg/dL)	46.0 ± 2.0	46.0 ± 1.8

Valores representam médias ± e.p.m., n = 5;

*** p < 0,001 (Teste t de Student não pareado)

* p < 0,05 (Teste t de Student não pareado)

Tabela 2 - Comparação entre os parâmetros de estresse oxidativo das proles adultas de animais expostos ao diabetes induzido por estreptozotocina (42 mg/kg i.p.) no período intra-uterino e controles não diabéticos (ND).

	Grupos	
	ND	DG
AGEs (u.a.)	6300,0 ± 210,0	7800,0 ± 340,0***
AOPP (μmol)	10,3 ± 0,5	20,5 ± 2,2*
TBARS ηmol MDA/mg de proteína	0,28 ± 0,0	0,38 ± 0,0*

Valores representam médias ± e.p.m., n = 5;

*** p < 0,001 (Teste t de Student não pareado)

* p < 0,05 (Teste t de Student não pareado)

Figura 1: Análise por Western Blot da expressão proteica do NF- κ B em aortas das proles adultas de animais expostos ao diabetes induzido por estreptozotocina (42 mg/kg i.p.) no período intra-uterino e de controles não diabéticos (ND, coluna branca). Os valores são expressos como média \pm e.p.m. de três experimentos independentes por grupo. * $p < 0,05$ (Teste t de Student não pareado).

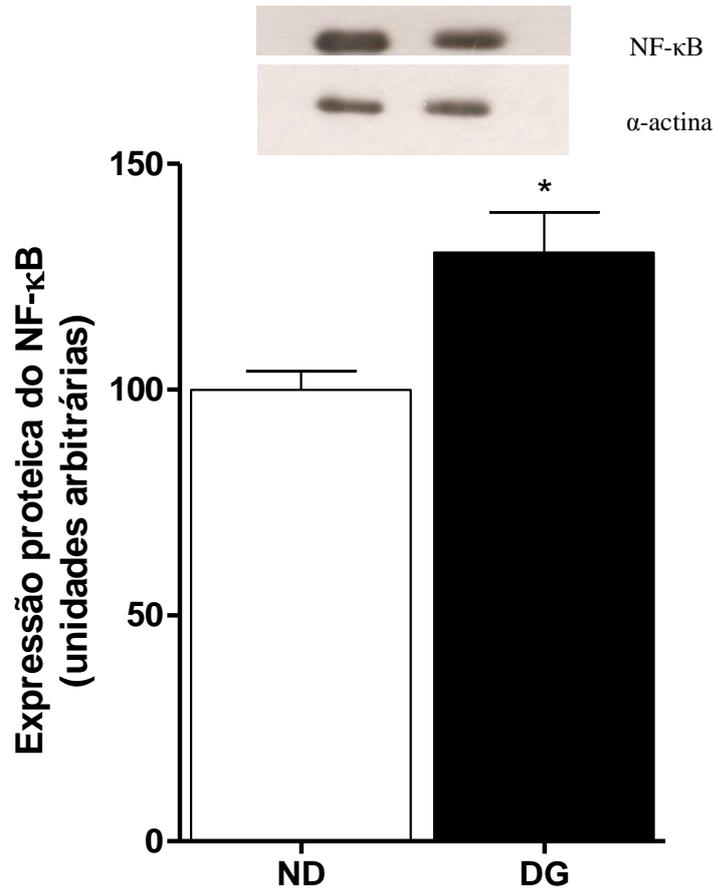


Figura 2: Expressão relativa de RNAm da IL-1 β aortas das proles adultas de animais expostos ao diabetes induzido por estreptozotocina (42 mg/kg i.p.) no período intra-uterino e de controles não diabéticos (ND, coluna branca). Os resultados são expressos como média \pm e.p.m., n = 4; do parâmetro $2^{\Delta\Delta Ct}$, representando a expressão relativa entre a IL-1 β e o gene de β -actina. (*p < 0,05; Teste t de Student não pareado).

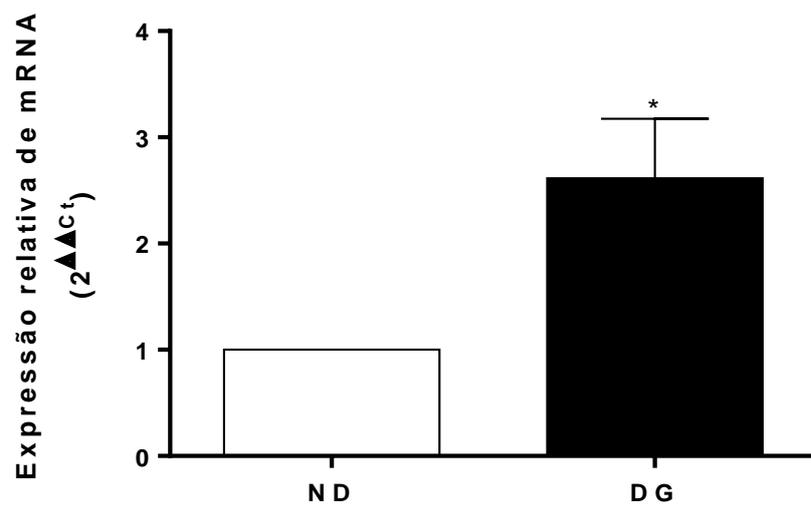


Figura 3: Expressão relativa de RNAm da Nox4 em aortas das proles adultas de animais expostos ao diabetes induzido por estreptozotocina (42 mg/kg i.p.) no período intra-uterino e de controles não diabéticos (ND, coluna branca). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n = 4; do parâmetro $2^{\Delta\Delta Ct}$, representando a expressão relativa entre a Nox4 e o gene de β -actina. (*p < 0,05; Teste t de Student não pareado).

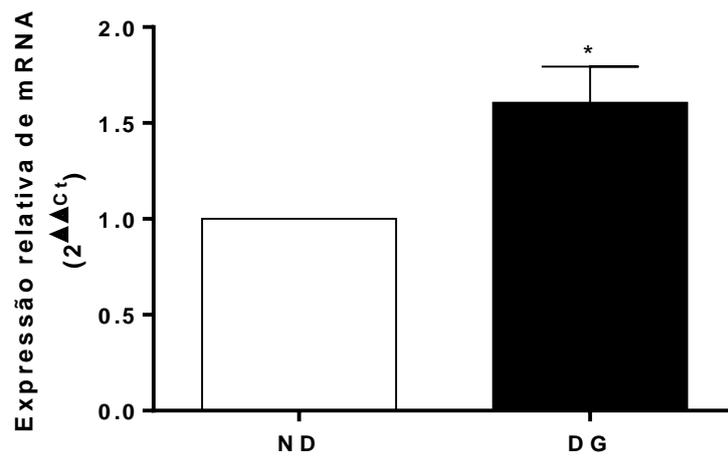
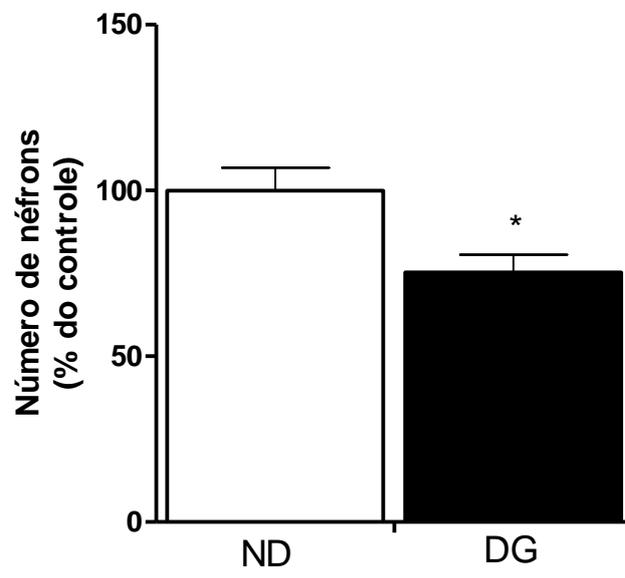


Figura 4. Quantificação do número de néfrons das proles adultas de animais expostos ao diabetes induzido por estreptozotocina (42 mg/kg i.p.) no período intra-uterino e de controles não diabéticos (ND, coluna branca). Os valores foram normalizados tendo como referência os controles (100%). Os valores são expressos como média \pm e.p.m; n = 5; * p < 0,001 (Teste t de Student não pareado).



6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a exposição intrauterina à hiperglicemia materna induz um estresse plasmático e tecidual associado ao aumento da expressão proteica do NF- κ B e de IL-1beta, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta.

ANEXO A: Instruções para Autores



Informações Gerais

Ressaltamos a importância de seguir estas instruções com atenção. O não respeito às normas acarretará atrasos ao processo de revisão do manuscrito (MS).

MS deve ser apresentado exclusivamente para os ABE&M, nunca ter sido publicado ou estar sob consideração para publicação, em forma substancial, em outro periódico, profissional ou leigo. O MS deve ser redigido em Inglês ou Português, em conformidade com as especificações descritas abaixo. Os autores que não são fluentes na forma escrita do idioma inglês recomenda-se que o seu MS seja revisado e editado por um expert nesse sentido antes da apresentação. Esta iniciativa deve facilitar e acelerar todo o processo de revisão e potencial publicação do seu MS.

Trabalhos que não cumpram estes requisitos serão devolvidos ao autor para adequação necessária antes da revisão pelo corpo editorial.

Todas as submissões são à princípio cuidadosamente avaliadas pelos editores científicos. Os MS que não estejam em conformidade com os critérios gerais para publicação serão devolvidos aos autores dentro de três a cinco dias. Os MS em conformidade são enviados habitualmente para dois revisores.

Categorias de Manuscritos

Contribuições originais de pesquisa podem ser submetidas aos ABE&M como artigo original ou comunicação resumida. Outras categorias especiais de MS são descritas abaixo. Todos os MS devem seguir as limitações de número de palavras para o texto principal, conforme especificado abaixo. O número total de palavras não inclui o resumo, as referências ou legendas de tabelas e figuras. O número de palavras deve ser anotado na página de rosto, juntamente com o número de figuras e tabelas. O formato é semelhante para todas as categorias de MS e é descrito em detalhes na seção "Preparação do Manuscrito".

Artigos Originais

O artigo original é um relatório científico dos resultados de pesquisa original, clínica ou laboratorial, que não tenha sido publicado, ou submetido para publicação, em outro periódico, seja em papel ou eletronicamente. O artigo original não deve exceder 3600 palavras no texto principal, não deve incluir mais de seis figuras e tabelas e ter até 35 referências.

Comunicação Resumida

A comunicação resumida consiste de dados originais de importância suficiente para justificar a publicação imediata. É uma descrição sucinta dos resultados confirmatórios ou negativos de um estudo focado, simples e objetivo. Objetividade e clareza aumentam a possibilidade de um manuscrito ser aceito para publicação como comunicação rápida. O texto principal deve ter no máximo 1500 palavras, até 20 referências e não mais que duas ilustrações (tabelas ou figuras ou uma de cada).

Artigos de Revisão

Os ABE&M publica artigos de revisão que apresentam uma avaliação crítica e abrangente da literatura sobre questões atuais no campo da endocrinologia e da metabologia nas áreas clínica ou básica. Todos os artigos de revisão são submetidos preferencialmente após convite dos ABE&M e estão sujeitos a revisão pelos pares. Artigos nesta categoria são encomendados pelos editores a autores com experiência comprovada na área de conhecimento, ou quando a proposta direcionada pelos autores em contato prévio, receber a aprovação do conselho editorial. Estes MS não devem ter mais de 4000 palavras no texto principal, não podem incluir mais de quatro figuras ou tabelas e até 60 referências. Os autores devem mencionar a fonte e/ou solicitar autorização para o uso de figuras ou tabelas publicadas previamente.

Diretrizes ou Consensos

Consensos ou diretrizes propostos por sociedades de profissionais, forças-tarefa e outras associações relacionadas com a Endocrinologia e Metabologia podem ser publicadas pela ABE&M. Todos os MS serão submetidos a revisão por pares, devem ser modificáveis

em resposta às críticas e serão publicados apenas se cumprirem as normas editoriais da revista. Estes MS habitualmente não devem ultrapassar 3600 palavras no texto principal, não devem incluir mais de seis figuras e tabelas e ter até 60 referências.

Relato de caso

Comunicação breve utilizada para apresentar relatos de casos, ou de caso isolado, de importância clínica ou científica. Estes relatórios devem ser concisos e objetivos. Devem conter dados de pacientes isolados ou de famílias que adicionem substancialmente conhecimento à etiologia, patogênese e história natural da condição descrita. O relato de caso deve conter até 2000 palavras, não incluir mais de quatro figuras e tabelas e ter até 30 referências.

Carta ao Editor

Cartas ao Editor podem ser apresentadas em resposta à artigos publicados no ABE&M nas últimas 3 edições. As cartas devem ser breves comentários relacionados a pontos específicos, de acordo ou desacordo, com o trabalho publicado. Dados originais publicados relacionados ao artigo publicado são estimulados. As cartas podem ter no máximo 500 palavras e cinco referências completas. Figuras e tabelas não podem ser incluídas.

Preparação do manuscrito

FORMATO GERAL

Os ABE&M exige que todos os manuscritos (MS) sejam apresentados em formato de coluna única, seguindo as seguintes orientações:

- O manuscrito deve ser apresentado em formato Word.
- Todo o texto deve ser em espaço duplo, com margens de 2 cm de ambos os lados, usando fonte Times New Roman ou Arial, tamanho 11.
- Todas as linhas devem ser numeradas, no manuscrito inteiro, e todo o documento deve ser paginado.
- Todas as tabelas e figuras devem ser colocadas após o texto e devem ser legendadas. Os MS

submetidos devem ser completos, incluindo a página de título, resumo, figuras e tabelas.

Documentos apresentados sem todos esses componentes serão colocados em espera até que o manuscrito esteja completo.

Todas as submissões devem incluir:

- Uma carta informando a importância e relevância do artigo e solicitando que o mesmo seja para publicação nos ABE &M. No formulário de inscrição os autores podem sugerir até três revisores específicos e / ou solicitar a exclusão de até outros três.

O manuscrito deve ser apresentado na seguinte ordem:

1. Página de título.
2. Resumo (ou Sumário para os casos clínicos).
3. Texto principal.
4. Tabelas e Figuras. Devem ser citadas no texto principal em ordem numérica.
5. Agradecimentos.
6. Declaração de financiamento, conflitos de interesse e quaisquer subsídios ou bolsas de apoio recebidos para a realização do trabalho
7. Referências .

Página de Título

A página de rosto deve conter as seguintes informações:

1. Título do artigo.
2. Nomes completos dos autores e coautores, departamentos, instituições, cidade e país.
3. Nome completo, endereço postal, e-mail, telefone e fax do autor para correspondência
4. Título abreviado de no máximo 40 caracteres para títulos de página
5. 5. Palavras-chave (recomenda-se usar MeSH terms e até 5).
6. 6. Número de palavras - excluindo a página de rosto, resumo, referências, figuras e tabelas.
7. 7. Tipo do manuscrito

Resumos

Todos os artigos originais, comunicados rápidos e relatos de casos deverão ser apresentados com resumos de no máximo 250 palavras. O resumo deve conter informações claras e objetivas sobre o estudo de modo que possa ser compreendido, sem consulta ao texto. O resumo deve incluir quatro seções que refletem os títulos das seções do texto principal. Todas as informações relatadas no resumo deve ter origem no MS. Por favor, use frases completas para todas as seções do resumo.

Introdução

O propósito da introdução é estimular o interesse do leitor para o trabalho em questão com uma perspectiva histórica e justificando os seus objetivos.

Materiais e Métodos

Devem ser descritos em detalhe como o estudo foi conduzido de forma que outros investigadores possam avaliar e reproduzir o trabalho. A origem dos hormônios, produtos químicos incomuns, reagentes e aparelhos devem ser indicados. Para os métodos modificados, apenas as novas modificações devem ser descritas.

Resultados e Discussão

A seção Resultados deve apresentar brevemente os dados experimentais tanto no texto quanto por tabelas e / ou figuras. Deve-se evitar a repetição no texto dos resultados apresentados nas tabelas. Para mais detalhes sobre a preparação de tabelas e figuras, veja abaixo. A Discussão deve se centrar na interpretação e significado dos resultados, com comentários objetivos, concisos, que descrevem sua relação com outras pesquisas nessa área. Na Discussão devemos evitar a repetição dos dados apresentados em Resultados, pode conter sugestões para explica-los e deve terminar com as conclusões.

Autoria

Os ABE&M adotam as diretrizes de autoria e de contribuição definidas pelo Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos (www.ICMJE.org). Co - autoria irrestrita é permitido. O crédito de autoria deve ser baseado apenas em contribuições substanciais para:

1. concepção e desenho, análise ou interpretação de dados
2. redação do artigo ou revisão crítica do conteúdo intelectual
3. aprovação final da versão a ser publicada.

Todas essas condições devem ser respeitadas. O primeiro autor é responsável por garantir a inclusão de todos os que contribuíram para a realização do MS e que todos concordaram com seu conteúdo e sua submissão aos ABE&M.

Conflito de Interesses

Uma declaração de conflito de interesse para todos os autores deve ser incluída no documento principal, seguindo o texto, na seção Agradecimentos. Mesmo que os autores não tenham conflito de interesse relevante a divulgar, devem relatar na seção Agradecimentos.

Agradecimentos

A seção Agradecimentos deve incluir os nomes das pessoas que contribuíram para o estudo, mas não atendem aos requisitos de autoria. Os autores são responsáveis por informar a cada pessoa listada na seção de agradecimentos a sua inclusão e qual sua contribuição. Cada pessoa listada nos agradecimentos deve dar permissão - por escrito, se possível - para o uso de seu nome. É da responsabilidade dos autores coletar essas informações.

Referências

As referências da literatura devem estar em ordem numérica (entre parênteses), de acordo com a citação no texto, e listadas na mesma ordem numérica no final do manuscrito, em uma página separada. Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. O número de referências citadas deve ser limitado, como indicado acima, para cada categoria de apresentação.

Tabelas

As tabelas devem ser apresentadas no mesmo formato que o artigo (Word). Atenção: não serão aceitas tabelas como arquivos de Excel. As tabelas devem ser auto-explicativas e os dados não devem ser repetidos no texto ou em figuras e conter as análises estatísticas. As tabelas devem ser construídas de forma simples e serem compreensíveis sem necessidade de referência ao texto. Cada tabela deve ter um título conciso. Uma descrição das condições experimentais pode aparecer em conjunto como nota de rodapé.

Gráficos e Figuras

Todos os gráficos ou Figuras devem ser numerados. Os autores são responsáveis pela formatação digital, fornecendo material adequadamente dimensionado. Todas as figuras coloridas serão reproduzidas igualmente em cores na edição online da revista, sem nenhum custo para os autores. Os autores serão convidados a pagar o custo da reprodução de figuras em cores na revista impressa. Após a aceitação do manuscrito, a editora fornecerá o valor dos custos de impressão.

Fotografias

Os ABE&M preferem publicar fotos de pacientes sem máscara. Encorajamos os autores a obter junto aos pacientes ou seus familiares, antes da submissão do MS, permissão para eventual publicação de imagens. Se o MS contiver imagens identificáveis do paciente ou informações de saúde protegidas, os autores devem enviar autorização documentada do próprio paciente, ou pais, tutor ou representante legal, antes do material ser distribuído entre os editores, revisores e outros funcionários dos ABE&M. Para identificar indivíduos, utilizar uma designação numérica (por exemplo, Paciente 1); não utilizar as iniciais do nome.

Unidade de Medida

Os resultados devem ser expressos utilizando o Sistema Métrico. A temperatura deve ser expressa em graus Celsius e tempo do dia usando o relógio de 24 horas (por exemplo, 0800 h, 1500 h).

Abreviaturas Padrão

Todas as abreviaturas no texto devem ser definidas imediatamente após a primeira utilização da abreviatura.

Pacientes

Para que o MS seja aceito para submissão, todos os procedimentos descritos no estudo devem ter sido realizados em conformidade com as diretrizes da Declaração de Helsinque e devem ter sido formalmente aprovados pelos comitês de revisão institucionais apropriados, ou seu equivalente.

As características das populações envolvidas no estudo devem ser detalhadamente descritas. Os indivíduos participantes devem ser identificados apenas por números ou letras, nunca por iniciais ou nomes. Fotografias de rostos de pacientes só devem ser incluídos se forem cientificamente relevantes. Os autores devem obter o termo de consentimento por escrito do paciente para o uso de tais fotografias. Para mais detalhes, consulte as Diretrizes Éticas.

Os pesquisadores devem divulgar aos participantes do estudo potenciais conflitos de interesse e devem indicar que houve esta comunicação no MS.

Animais de Experimentação

Deve ser incluída uma declaração confirmando que toda a experimentação descrita no MS foi realizada de acordo com padrões aceitos de cuidado animal, como descrito nas Diretrizes Éticas.

Descrição Genética Molecular

Usar terminologia padrão para as variantes polimórficas, fornecendo os números de rs para todas as variantes relatadas. Detalhes do ensaio, como por exemplo as sequências de iniciadores de PCR, devem ser descritos resumidamente junto aos números rs. Os heredogramas devem ser elaborados de acordo com normas publicadas em Bennett et al. *J Genet Counsel* (2008) 17:424-433 -. DOI 10.1007/s10897-008-9169-9.

Nomenclaturas

Para genes, use a notação genética e símbolos aprovados pelo Comité de Nomenclatura HUGO Gene (HGNC) - (<http://www.genenames.org/~V>).

Para mutações siga as diretrizes de nomenclatura sugeridos pela Sociedade Human Genome Variation (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>)

- Fornecer e discutir os dados do equilíbrio Hardy-Weinberg dos polimorfismos analisado na população estudada. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ajudar na descoberta de erros de genotipagem e do seu impacto nos métodos analíticos.
- Fornecer as frequências originais dos genótipos, dos alelos e dos haplotipos
- Sempre que possível, o nome genérico das drogas devem ser referidos. Quando um nome comercial de propriedade é usado, ele deve começar com letra maiúscula.
- Siglas devem ser usados com moderação e totalmente explicadas quando usadas pela primeira vez.

TRABALHOS APRESENTADOS EM INGLÊS

O MS deve ser escrito em Inglês claro e conciso. Evite jargões e neologismos. A revista não está preparada para realizar grandes correções de linguagem, o que é de responsabilidade do autor. Se o Inglês não é a primeira língua dos autores, o MS deve ser revisado por um especialista em língua inglesa ou um nativo. Para os não-nativos da língua inglesa e autores internacionais que gostariam de assistência com a sua escrita antes da

apresentação, sugerimos o serviço de edição científica do American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/index.php>) ou o PaperCheck (<http://www.papercheck.com/>).