



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA BORECKI VIDIGAL

**A EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA À METFORMINA FOI
SEGURA PARA A FUNÇÃO DO ENDOTÉLIO E DO TECIDO
ADIPOSO PERIVASCULAR DA AORTA ABDOMINAL NA
PROLE ADULTA**

Londrina
2018

CAMILA BORECKI VIDIGAL

**A EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA À METFORMINA FOI
SEGURA PARA A FUNÇÃO DO ENDOTÉLIO E DO TECIDO
ADIPOSO PERIVASCULAR DA AORTA ABDOMINAL NA
PROLE ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vidigal, Camila.

A exposição intrauterina à metformina foi segura para a função do endotélio e do tecido adiposo perivascular da aorta abdominal na prole adulta / Camila Vidigal. - Londrina, 2018.

47 f. : il.

Orientador: Graziela Sciantti Ceravolo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Reatividade vascular - Tese. 2. Metformina - Tese. 3. Tratamento materno - Tese. 4. Desenvolvimento intrauterino - Tese. I. Sciantti Ceravolo, Graziela . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

CAMILA BORECKI VIDIGAL

**A EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA À METFORMINA FOI SEGURA PARA
A FUNÇÃO DO ENDOTÉLIO E DO TECIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR DA AORTA ABDOMINAL NA PROLE ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Graziela Sciantti
Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho à memória de meu pai, Julio Maria Vidigal, minha inspiração eterna na busca de conhecimento e evolução. Dedico também este trabalho à minha mãe, Edevirges Borecki, sem a qual nada seria possível, e à minha avó Mercedes Martins Vidigal, por ser meu maior exemplo de amor, dedicação e persistência com a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e disposição.

Agradeço especialmente à minha orientadora Graziela S. Ceravolo, por tudo que representa para mim. Agradeço por ter me aceitado como sua orientanda, por me ensinar a ser uma pesquisadora, a ter um senso crítico, a buscar sempre evoluir como profissional e ser humano. Aprendo a cada dia com você que o que fazemos tem um impacto na vida de diversas pessoas e que aquilo que fazemos com amor prospera na vida!

Agradeço a CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço à minha família por todo amor e incentivo! Em especial à minha madrinha Dirce, que sempre me incentiva na busca por conhecimento. Ao meu irmão Tiago, meu parceiro na vida acadêmica, obrigada por todos os conhecimentos compartilhados e por todo incentivo. Agradeço ao meu irmão Julio Cezar, por sempre se fazer presente, mesmo na distância. Agradeço à minha mãe por aceitar e incentivar minhas escolhas na vida. E não posso deixar de ser grata à minha vovó Mercedes, a qual me ensinou e ensina tantas lições ao longo desses quase 10 anos de convivência!

Agradeço aos meus companheiros e amigos do laboratório, que com a ajuda de todos foi possível a concretização deste sonho! Em especial, agradeço as doutorandas Daniella de Novi (Dani) e Carolina Higashi (Caroline) por todo conhecimento compartilhado e ensinamentos, e a minha parceira Kawane Moura (Kaw), não sei nem dizer quantos foram os finais de semana revezados de trabalho, de preocupações e receios compartilhados, obrigada por esta amizade.

Agradeço aos meus amigos do mestrado, Matheus e Lorena, por aguentarem minhas lamentações, pelas viagens em congressos e disciplinas. Agradeço aos colegas do departamento, pelas histórias, alegrias e dificuldades que já compartilhamos juntos. Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram presente e sempre me incentivaram a ser a melhor versão de mim mesma. Em especial, agradeço minha querida amiga Camila, que fielmente está sempre disposta a me ajudar!

Agradeço à todos os professores do mestrado, pela paciência e dedicação no ensino, buscando formar profissionais qualificados e interessados. Agradeço também aos técnicos do departamento, em especial à Fujiko pelo zelo com os animais. Enfim, à todos que de alguma forma participaram desta fase da minha vida, minha gratidão eterna!

“Torna-te quem tu és.”
Nietzsche

VIDIGAL, Camila Borecki. **A exposição intrauterina à metformina foi segura para a função do endotélio e do tecido adiposo perivascular da aorta abdominal na prole adulta.** 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A biguanida metformina (MET) têm sido utilizada durante a gestação para o tratamento de síndrome do ovário policístico e diabetes gestacional. MET atravessa a membrana placentária e o tratamento materno pode expor a progênie a esta droga durante fases importantes do desenvolvimento. Efeitos benéficos diretos vasculares têm sido descritos com o tratamento de metformina em humanos com diabetes mellitus. Ainda, esta biguanida têm demonstrado efeitos protetivos sob o endotélio vascular e o tecido adiposo perivascular (PVAT) de ratos e camundongos obesos ou diabéticos, melhorando vasodilatação dependente de endotélio e corrigindo a expressão de adipocitocinas liberadas pelo PVAT. Entretanto, não está claro se a exposição intrauterina à metformina é segura ao sistema vascular da prole. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos intrínsecos da exposição *in útero* à metformina na reatividade da aorta abdominal da prole na presença ou ausência de PVAT e endotélio. Para isto, ratas Wistar foram tratadas com 293 mg/kg/dia de metformina (MET) ou água (CTR) por gavagem durante o período gestacional. Na prole masculina adulta, foi avaliada a reatividade da aorta abdominal para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio. O relaxamento da aorta abdominal foi semelhante entre os grupos MET e CTR na presença e ausência de PVAT. Além disso, a contração à fenilefrina foi similar entre os grupos MET e CTR na presença e ausência do PVAT e do endotélio. Portanto, a exposição à metformina durante a gestação não tem efeito intrínseco na função endotelial e do PVAT da aorta abdominal, mostrando ser uma droga segura para o sistema vascular da prole.

Palavras-chave: Tratamento materno. Reatividade vascular. Anti-hiperglicêmico. Biguanida. Desenvolvimento intrauterino.

VIDIGAL, Camila Borecki. **Metformin intrauterine exposure was safe for the function of the endothelium and perivascular adipose tissue in abdominal aorta of adult offspring.** 2018. 48 p. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The biguanide metformin (MET) has been used during pregnancy for the treatment of polycystic ovary syndrome and gestational diabetes. MET crosses placenta and maternal treatment can expose the progeny to this drug during important phases of body development. Direct vascular protective effects have been described with the treatment of metformin in humans with diabetes mellitus. Furthermore, this biguanide has demonstrated protective effects under the vascular endothelium and perivascular adipose tissue (PVAT) of obese or diabetic rats and mice, improving endothelium-dependent vasodilatation and correcting the expression of adipocytokines released by PVAT. Nevertheless, it is unclear whether intrauterine exposure to metformin is safe for the vascular system of offspring. Thus, the present study aimed to investigate the intrinsic effect of metformin exposure *in utero* in the offspring abdominal aorta reactivity in the presence and absence of perivascular adipose tissue (PVAT) and endothelium. For this, Wistar rats were treated with metformin 293 mg/kg/day (MET) or water (CTR) by gavage during gestational period. It was evaluated in male adulthood offspring the abdominal aorta reactivity to phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprussiate. It was observed that abdominal aorta's relaxation was similar between MET and CTR groups in the presence or absence of PVAT. Also, the contraction to phenylephrine was similar between MET and CTR groups in the presence and absence of PVAT and endothelium. Therefore, metformin exposed during pregnancy had no intrinsic effect in the offspring abdominal aorta PVAT and endothelial function, showing to be safe to the vascular system of the offspring.

Keywords: Maternal treatment. Vascular reactivity. Anti-hyperglycemic. Biguanide. Intrauterine development.

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1** – Parâmetros maternos e da prole27
- Tabela 2** – Resposta máxima e pD₂ (logaritmo negativo da concentração do agonista resultando em 50% da resposta máxima) para fenilefrina em anéis com (Endo+) e sem endotélio (Endo-), na presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular28
- Figura 1** – Curvas concentração efeito cumulativa para fenilefrina em anéis isolados com (Endo+; A) e sem (Endo-; B) endotélio, em presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular da prole masculina adulta exposta à metformina (MET) ou água (CTR) durante o período gestacional.28
- Tabela 3** – Resposta máxima e pD₂ (logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima) para acetilcolina em anéis com endotélio, na presença (PVAT+) ou ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular.....30
- Tabela 4** – Resposta máxima e pD₂ (logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima) para nitroprussiato de sódio em anéis sem endotélio, na presença (PVAT+) ou ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular.30
- Figura 2** – Curvas concentração efeito cumulativa para acetilcolina (A) e nitroprussiato de sódio (B) em anéis aórticos isolados com (Endo+) e sem (Endo-) endotélio, na presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular da prole masculina adulta exposta à metformina (MET) ou água (CTR) durante o período gestacional.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AMPK	Proteína quinase ativada pelo AMP
ANG II	Angiotensina II
BW $\frac{3}{4}$	<i>Body Weight</i> $\frac{3}{4}$
CCE	Curva concentração-efeito cumulativa
CTR	Controle
DM II	Diabetes Mellitus II
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
Endo+	Endotélio preservado
Endo-	Endotélio removido
EDCF	Fatores contráteis derivados do endotélio
EDRF	Fatores relaxantes derivados do endotélio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fenil	Fenilefrina
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
KCl	Cloreto de Potássio
MET	Metformina
n	Número de animais por grupo
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
pD ₂	Logaritmo negativo da concentração efetiva em 50% da resposta máxima
PGI ₂	Prostaciclina
PVAT	Tecido adiposo perivascular
PVAT+	presença de tecido adiposo perivascular
PVAT-	ausência de tecido adiposo perivascular
R _{max}	Resposta máxima
SIRT-1	Sirtuína 1
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UCP-1	proteína desacopladora 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Teoria Desenvolvimentista da Saúde e da Doença	16
1.2	Função vascular e papel do tecido adiposo perivascular	17
1.3	Metformina	19
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Animais e Tratamento	24
3.2	Avaliação da Reatividade Vascular	25
3.3	Análise Estatística	26
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXOS	47
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e uso de animais	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Teoria Desenvolvimentista da Saúde e da Doença

A partir de estudos de coorte realizados por Barker e colaboradores na década de 1980 descrevendo relações entre peso ao nascer, hipertensão e doenças cardiovasculares em humanos (BARKER et al., 1989), surge o interesse clínico em investigar se doenças de início tardio podem ser originadas de eventos que ocorram durante o desenvolvimento intrauterino.

Um estudo de coorte realizado com filhos de mulheres expostas à fome holandesa de 1944-1945, período da Segunda Guerra Mundial, demonstrou que a exposição durante o primeiro trimestre de gestação resultou em maior incidência de obesidade na progênie durante a vida adulta (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Posteriormente, foram demonstradas relações inversas entre o peso ao nascer e incidência de dislipidemia, diabetes mellitus II e acidente vascular encefálico (BARKER, 1995). Estes fenômenos deram origem ao conceito de Teoria Desenvolvimentista da Saúde e da Doença.

A Teoria Desenvolvimentista da Saúde e da Doença traz que eventos que ocorram durante o desenvolvimento do organismo, como a presença de doenças durante a gestação ou exposição materna à xenobióticos, podem influenciar tardiamente a saúde do indivíduo (SINCLAIR et al., 2007; GLUCKMAN et al., 2009). O ambiente externo é capaz de alterar a expressão de genes e mudar o fenótipo, em parte por mudanças no epigenoma, o qual é composto por mecanismos epigenéticos (JIRTLE; SKINNER, 2007). Assim, fatores epigenéticos parecem ser os mecanismos pelos quais o ambiente durante fases iniciais do desenvolvimento influencia o fenótipo adulto.

O termo epigenética significa “em adição à informação genética codificada no DNA” (FEINBERG; TYCKO, 2004), refere-se a mudanças hereditárias na função gênica que ocorrerem sem alteração na sequência do DNA. Essas mudanças surgem principalmente como consequência de modificações covalentes específicas no DNA e suas proteínas associadas (modificações de histonas), que atuam em conjunto com a estrutura da

cromatina para definir o transcriptoma associado a uma linhagem celular específica (SINCLAIR et al., 2007).

Os mecanismos epigenéticos regulam muitos processos celulares direta ou indiretamente e são um processo crítico na resposta celular ao ambiente externo e estímulos endógenos (FEINBERG; TYCKO, 2004). Mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, eventos como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação nas histonas, mudanças na conformação da cromatina e o silenciamento mediado por RNA (RODENHISER, 2006; MOSS; WALLRATH, 2007). Deste modo, alterações epigenéticas podem ser desencadeadas no genoma de um indivíduo em qualquer momento de sua vida, sendo o epigenoma particularmente susceptível à desregulação por fatores ambientais (como o estresse, hábitos alimentares, atividade física e uso de medicamentos) durante a gestação, desenvolvimento neonatal, puberdade e idade adulta (DE BRITO OLIVEIRA COSTA; PACHECO, 2013).

1.2 Função Vascular e papel do tecido adiposo perivascular

As artérias são os vasos sanguíneos que têm por função transportar o sangue sob alta pressão para os tecidos. Estruturalmente, artérias são compostas pelas camadas adventícia, média e íntima, sendo circundadas por tecido adiposo perivascular (PVAT). A camada adventícia é a camada mais externa do vaso sanguíneo; consiste em tecido conjuntivo denso composto de fibroblastos, macrófagos, fibras colágenas, fibras elásticas e terminações nervosas, as quais podem liberar substâncias vasoativas. A camada média é composta essencialmente por células musculares lisas e elastina, compreende a unidade funcional do vaso sanguíneo devido suas propriedades de constrição e relaxamento. A camada íntima por sua vez, é composta por células endoteliais, as quais desempenham importantes papéis na homeostasia cardiovascular (CHEN; KASSAB, 2016).

O endotélio atua como sensor de alterações hemodinâmicas, tem papel na angiogênese, coagulação e fibrinólise, produzindo mediadores que interferem no crescimento, atividade, migração e morte celular (CARVALHO et

al., 2001). Substâncias liberadas pelo endotélio modulam o controle do tônus vascular, tais substâncias são conhecidas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Os EDRFs são óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Os EDCFs compreendem a Angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1), as espécies reativas do oxigênio (EROs) e os prostanóides vasoconstritores (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Desequilíbrios na produção e/ou liberação desses fatores caracterizam um quadro de disfunção endotelial, o que predispõe o indivíduo às doenças cardiovasculares. De um modo geral, na disfunção endotelial encontra-se aumento na produção de EROs, prejuízo na biodisponibilidade do NO, aumento de apoptose endotelial e redução da vasodilatação dependente do endotélio (STEINBERG et al., 2000; ARTWOHL et al., 2004).

O PVAT, localizado ao redor dos vasos sanguíneos, consiste em diferentes tipos celulares, dentre eles, adipócitos, fibroblastos, células tronco, macrófagos e nervos. Este tecido libera diversas substâncias vasoativas como ANG II, EROs, NO, adipocinas (leptina, adiponectina, resistina), citocinas (IL-1, IL-6, TNF α), que influenciam ou modulam a função vascular, exercendo seus efeitos no músculo liso e células endoteliais vasculares (SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013; ALMABROUK et al., 2014). Desta forma, o PVAT participa do controle do tônus, migração celular, proliferação celular e inflamação no vaso sanguíneo.

A aorta é a artéria de maior calibre do corpo, apresenta alta complacência e elasticidade, sendo capaz de transformar o fluxo sanguíneo intermitente gerado pelos batimentos cardíacos em fluxo contínuo para o restante da circulação (NEVES et al., 2012). É importante destacar que existem diferenças biomecânicas, histológicas e funcionais entre as regiões da aorta. A aorta torácica (região localizada acima do diafragma) apresenta maior diâmetro, maior resistência mecânica e elasticidade do que a região abdominal da aorta (localizada logo abaixo do diafragma) (NINOMIYA et al., 2015). Além disso, ao longo da aorta existem diferenças fenotípicas no PVAT (GIL-ORTEGA et al., 2015; VICTORIO et al., 2016).

O fenótipo do PVAT na região torácica da aorta caracteriza-se por tecido adiposo marrom, enquanto na região abdominal se assemelha ao tecido adiposo branco (GIL-ORTEGA et al., 2015; VICTORIO et al., 2016). O tecido adiposo marrom é tradicionalmente associado à termogênese e é composto de adipócitos multiloculares, com grande quantidade de mitocôndrias que expressam altas quantidades de proteína desacopladora 1 (UCP-1), responsável pela atividade termogênica deste tecido. O tecido adiposo branco é tradicionalmente visto como um local de armazenamento de lipídios; apresenta menor vascularização, inervação e atividade metabólica que o tecido adiposo marrom (SZASZ; WEBB, 2012).

Foi demonstrado que o PVAT marrom é resistente à dieta rica em lipídeos e hipóxia (GIL-ORTEGA et al., 2015), enquanto que o PVAT branco é altamente responsivo à dieta rica em lipídeos e hipóxia com aumento na expressão de citocinas e infiltração de macrófagos (POLICE et al., 2009). Deste modo, fica evidente que as propriedades inerentes das diferentes regiões da aorta estão envolvidas com a suscetibilidade à lesão, sendo a lesão aterosclerótica aórtica e o desenvolvimento de aneurismas predominantes na região abdominal deste vaso (VICTORIO et al., 2016).

1.3 Metformina

Metformina é um agente anti-hiperglicêmico da classe das biguanidas que reduz a glicemia sem estimular a secreção de insulina (STUMVOLL et al., 1995; ZHAO et al., 2015). O efeito anti-hiperglicêmico deste fármaco é devido principalmente à redução da gliconeogênese hepática (STUMVOLL et al., 1995) e melhora na captação de glicose nos tecidos periféricos (MATTHAEI et al., 1991; HUNDAL et al., 1992), por meio da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), uma proteína serina/treonina quinase envolvida na regulação da energia celular (ZOU et al., 2004; HARDIE, 2011).

O mecanismo pelo qual a metformina ativa AMPK não é completamente compreendido. A metformina tem demonstrado inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, o que resulta em aumento na relação AMP/ATP, e conseqüentemente ativação de AMPK (OWEN; DORAN; HALESTRAP, 2000).

Uma vez ativada, AMPK atua inibindo vias metabólicas que consomem ATP (como vias anabólicas da síntese de colesterol ou ácidos graxos) e ativando vias metabólicas que produzem ATP (como vias catabólicas de oxidação de glicose e ácidos graxos). No fígado, a ativação do AMPK inibe a transcrição das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase, resultando na diminuição da gliconeogênese (LOCHHEAD et al., 2000; COOL et al., 2006). Além disso, leva a inibição de enzimas chave na síntese de triglicerídeos e colesterol tais como acetil-CoA carboxilase e 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), resultando na melhora do metabolismo lipídico observado com o tratamento da metformina (HENIN et al., 1995; ZHOU et al., 2001; VIOLLET et al., 2009). Ainda, o aumento da atividade de AMPK está associado com maior translocação do transportador de glicose, GLUT4, para a superfície da membrana plasmática e maior sensibilidade à insulina no músculo esquelético (SCHIMMACK; DEFRONZO; MUSI, 2006; DZAMKO; STEINBERG, 2009).

A AMPK além de atuar como um sensor energético e exercer ações metabólicas importantes, também desempenha papel importante na regulação do tônus vascular e do PVAT (ZHANG, 2006; ALMABROUK et al., 2014). Estudos sugerem que a AMPK endotelial tem papel na modulação do suprimento energético das células endoteliais e ainda na regulação da inflamação, angiogênese, manutenção da perfusão, proteção contra apoptose, mediação da ativação de NO sintase endotelial em resposta a força de cisalhamento (DAGHER et al., 1999; IDO; CARLING; RUDERMAN, 2002; NAGATA; MOGI; WALSH, 2003; OUCHI, 2005; ZHANG, 2006). Ainda, parece que a AMPK presente no PVAT é um importante intermediário nas ações de alguns mediadores liberados pelo PVAT, como a adiponectina (ALMABROUK et al., 2014).

Interessantemente, tem sido descrito alguns efeitos da metformina mediados via modulação de SIRT-1, a metformina aumenta a expressão deste regulador metabólico celular por uma via independente de AMPK (MATTAGAJASINGH et al., 2007). SIRT-1 é uma molécula multifuncional, capaz de suprimir a inflamação, modular o metabolismo de glicose e de lipídios, e melhorar função mitocondrial (RUDERMAN et al., 2010). No sistema

vascular, SIRT-1 está associada com aumento da biodisponibilidade de NO, proliferação celular e angiogênese (MATTAGAJASINGH et al., 2007; POTENTE et al., 2007).

Metformina é usada na gestação, em mulheres com diabetes mellitus gestacional (DMG) e síndrome do ovário policístico (SOP). De acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*), esta biguanida é considerada categoria B durante a gestação, o que significa que existem estudos insuficientes em humanos, entretanto não foram demonstrados efeitos teratogênicos em animais (GLUECK et al., 2002; JOHNSON, 2011; MORIN-PAPUNEN et al., 2012; SARA W. REECE, HARISH S. PARIHAR, 2014). A metformina atravessa livremente a membrana placentária e tem sido detectada no cordão umbilical em concentrações similares às do sangue materno (VANKY et al., 2005; CHARLES et al., 2006; ZHAO et al., 2015). Deste modo, o tratamento materno com metformina pode expor a progênie a esta droga durante importantes fases do desenvolvimento do organismo, o que pode por sua vez, levar a modificações morfológicas e funcionais em órgãos alvo em seus descendentes.

Neste contexto, recentemente foi demonstrado em ratos Wistar que a exposição intrauterina e lactacional à metformina têm implicações nos parâmetros reprodutivos da prole masculina na vida adulta, tais como alterações no comportamento sexual e diminuição na contagem espermática (FORCATO et al., 2017). Ainda, em camundongos C57/BL6NHsd, a exposição intrauterina à metformina causou efeitos tardios na prole que se tornaram evidentes durante uma fase de dieta rica em lipídeos, na qual a prole apresentou aumento do peso corpóreo e do depósito de tecido adiposo visceral na vida adulta (SALOMÄKI et al., 2013). Evidenciando assim que a exposição intrauterina à metformina pode trazer repercussões tardias na prole.

Efeitos cardiovasculares benéficos têm sido descrito para o tratamento com metformina, especialmente na obesidade e no diabetes mellitus (SENA et al., 2011; CITTADINI et al., 2012). Em modelo de ratos espontaneamente hipertensos com resistência à insulina, a metformina previne o desenvolvimento de falência cardíaca crônica, o que está associado com melhora na biodisponibilidade de NO e maior regulação do fator de crescimento

endotelial vascular (CITTADINI et al., 2012). Além disso, em ratos diabéticos expostos a dieta rica em lipídeos e em ratos obesos não diabéticos, a metformina corrige a disfunção endotelial presente nesses animais, por meio de melhora na biodisponibilidade de NO, redução de estresse oxidativo e inflamação (SENA et al., 2011; LOBATO et al., 2012). Ainda, foi demonstrado em ratos que a dieta rica em frutose induz desregulação na expressão de adipocinas no PVAT e perda da vasodilatação dependente de endotélio; tais alterações também podem ser revertidas pelo tratamento com metformina, por meio de maior fosforilação de AMPK e SIRT-1 (SUN et al., 2014).

De um modo geral, sugere-se que os efeitos benéficos da metformina sobre o sistema vascular envolvem aumento na produção de NO, efeito antioxidante com diminuição de espécies reativas de oxigênio, diminuição na inflamação e maior fosforilação de AMPK e SIRT-1 (SENA et al., 2011; CITTADINI et al., 2012; SUN et al., 2014). Entretanto, há uma obscuridade em relação ao efeito da exposição intrauterina à metformina sobre sistema vascular da progênie. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a exposição intrauterina à metformina em ratos Wistar não interferiu com a função endotelial da aorta torácica na prole adulta (NOVI et al., 2017). Todavia, os efeitos desta exposição sob a função do PVAT e do endotélio na aorta abdominal até o momento não foram investigados.

Considerando os efeitos diretos benéficos do tratamento com metformina e trabalhos recentes do nosso grupo demonstrando que a exposição *in útero* à metformina não interferiu na função endotelial da aorta torácica, a hipótese deste estudo foi que a exposição intrauterina à metformina é segura para a reatividade da aorta abdominal na progênie, não interferindo com a função do PVAT e do endotélio vascular.

2. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos intrínsecos da exposição *in útero* à metformina sobre a reatividade vascular da prole, na presença e ausência do PVAT e do endotélio vascular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Tratamento

Ratos Wistar foram obtidos da colônia do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas. Após um período de adaptação, os animais (machos, n=10 e fêmeas, n=23) foram utilizados para o acasalamento.

Para o acasalamento, no final da tarde foram colocadas duas ratas para um rato na mesma gaiola. Na manhã do dia seguinte foi realizado o esfregaço vaginal e em seguida realizado análise da lâmina em microscopia de luz, sendo diagnosticado prenhez se observado presença de espermatozoides e a fase estro. Após o diagnóstico de prenhez, as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais e aleatorizadas para os seguintes grupos experimentais (11-12 mães/grupo):

- Controle (CTR): ratas que receberam água por gavagem do dia do diagnóstico de prenhez, considerado dia gestacional 0 (DG 0) ao dia do nascimento dos filhotes, considerado dia gestacional 21 (DG 21);

- Metformina (MET): ratas que receberam 293mg/kg de metformina diluída em H₂O (Glifage®, Laboratório MERCK S.A, Brasil) por gavagem do dia do diagnóstico de prenhez, considerado DG 0 ao dia do nascimento dos filhotes, considerado DG 21;

A dose recomenda de metformina durante a gestação em humanos é de 500 mg/dia (CHO et al., 2009; EYAL et al., 2010) o que equivale a 7.14 mg/kg/dia para um adulto de 70 kg. Aplicando a escala $BW^{3/4}$ (EPA, 2006), um procedimento de extrapolação que permite determinar doses toxicologicamente equivalentes entre animais e humanos, foi obtido o valor de 29,26 mg/kg/dia. Considerando a variação interespécie e que o metabolismo do rato é dez vezes mais rápido do que no humano a dose escolhida foi 293 mg/kg/dia (NOVI et al., 2017). O peso das ratas prenhes foi obtido a cada três dias durante toda a gestação para ajuste de dose, sendo descrito como variação de ganho de peso ($\Delta = \text{DPN1} - \text{DG0}$). O dia do nascimento dos filhotes foi denominado dia pós-natal (DPN) 0. No DPN 1, os filhotes foram identificados por sexo e no DPN 4

houve redução de ninhada para dez filhotes (seis machos e quatro fêmeas). Os filhotes foram pesados no DPN 1, 4, 7, 14 e 21 quando houve o desmame e alocação em seus grupos (5 ratos machos por caixa).

As proles masculinas foram avaliadas na fase adulta (DPN 75-80), sendo que cada ninhada constituiu uma unidade experimental. Todos os animais foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, com acesso livre à água e ração (Nuvital®) para roedores.

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA / UEL: 6996.2015.02).

3.2 Reatividade Vascular

Os ratos dos diferentes grupos foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p. – Cristália, Brasil), e após laparotomia a aorta abdominal foi removida e seccionada em quatro segmentos (3mm de comprimento). A reatividade da aorta abdominal foi avaliada em anéis com PVAT (PVAT+) e sem PVAT (PVAT-), na presença (Endo+) e ausência (Endo-) de endotélio. O PVAT foi removido por dissecação e o endotélio foi cuidadosamente removido por fricção com haste fina contendo algodão.

Os anéis de aorta foram montados em um banho de órgãos isolados, contendo solução de Krebs-Henseleit (contendo em mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 25 NaHCO₃, 2,5 CaCl₂.2H₂O, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄.7H₂O, 11 glicose e 0,01 EDTA), continuamente aerados com 95% de O₂ e 5% de CO₂, mantidos sob tensão basal de 1,5 g a 37 °C e pH 7,4, como previamente descrito pelo nosso grupo (CERAVOLO et al., 2013; HIGASHI et al., 2016). A força isométrica foi registrada usando um transdutor (FT03, Grass) conectado a um sistema de aquisição acoplado em um computador.

A funcionalidade de células musculares lisas foi testada com KCl (90mM) e do endotélio foi testada com acetilcolina (ACh 3 µM). O endotélio foi

considerado intacto quando o relaxamento induzido por ACh foi maior que 80% e foi considerado removido quando o relaxamento foi menor que 5% da pré-contracção. Foram realizadas curvas concentração efeito cumulativas (CCE) para fenilefrina (Fenil, 1nM-300µM), um agente vasoconstritor agonista seletivo de receptores α 1- adrenérgicos, sendo as respostas expressas como a percentagem de contracção do KCl . Em outras séries de experimentos, a vasodilatação dependente de endotélio foi avaliada usando ACh (1nM-30µM) e a sensibilidade das células musculares lisas ao NO foi avaliada usando nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1nM-30µM), ambos após a contracção com concentração submáxima de Fenil, sendo o relaxamento expresso como percentagem da pré-contracção.

Para as CCE para Fenil, ACh and NPS a resposta máxima (R_{max}) e o log da concentração do agonista resultando em 50% da R_{max} (pD_2) foram calculadas utilizando uma análise de regressão não-linear (GraphPad Prism software, USA).

3.3 Estatística

Inicialmente, análise exploratória dos dados foi realizada para avaliar a distribuição normal (Shapiro-Wilk test e Kolmogorov-Smirnova test) e homogeneidade de variância (Levene's test) para cada variável. As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foram analisadas pelo Teste T Student (peso corporal da prole, variação do ganho de peso das mães, número de animais/ninhada) ou Two-way ANOVA (reatividade vascular). Quando necessário, as variáveis foram log-transformadas para normalizar a distribuição de dados (peso dos filhotes ao nascer). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas se $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS (IBM, SPSS Statistics v19, NY, EUA) e os gráficos foram realizados usando o software Prism 6 (Graph Pad Software, Inc., CA, EUA).

4. RESULTADOS

Os parâmetros maternos e da progênie estão descritos na tabela 1. Não houve diferença significativa na variação de ganho de peso materno (Δ) [$t(21)=0,597$, $p=0,557$], peso da prole ao nascer [$t(21)=0,810$, $p=0,427$], número de filhotes por ninhada [$t(21)=0,755$, $p=0,459$] e peso dos machos na vida adulta [$t(21)=0,763$, $p=0,454$] entre os grupos MET e CTR, como evidenciado pelo Teste T Student.

Tabela 1. Parâmetros maternos e da prole

	Varição do ganho de peso das mães (g)	Peso dos filhotes ao nascer (g)	Número de filhotes/ninhada	Peso dos machos adultos (g)
CTR	34,22±2,24 [11]	1,85±0,02 [11]	12,45±0,76 [11]	357,52±8,80 [11]
MET	31,93±3,04 [12]	1,83±0,02 [12]	11,75±0,57 [12]	369,33±12,40 [12]

Dados são representados como média \pm E.P.M. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. Test t-Student, $p>0,05$. CTR: prole exposta à água durante o período gestacional; MET: prole exposta à metformina durante o período gestacional.

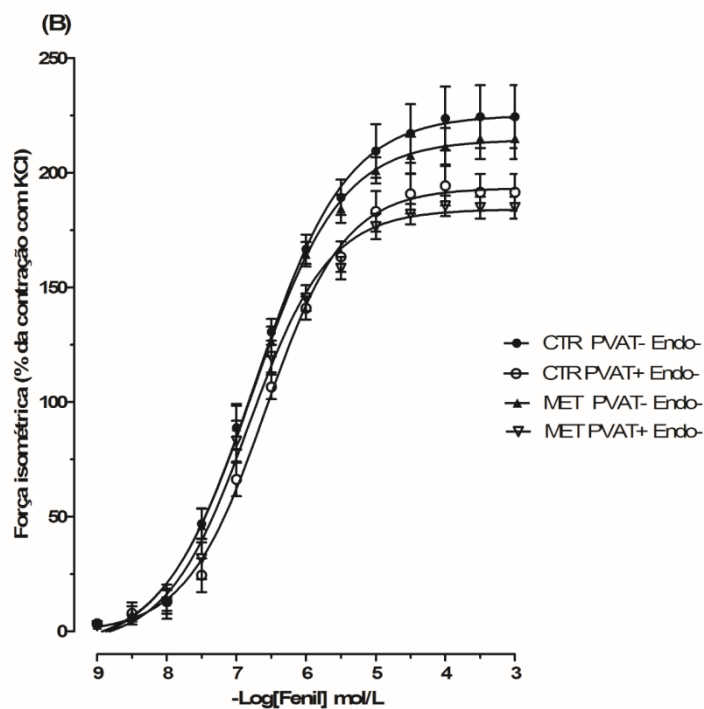
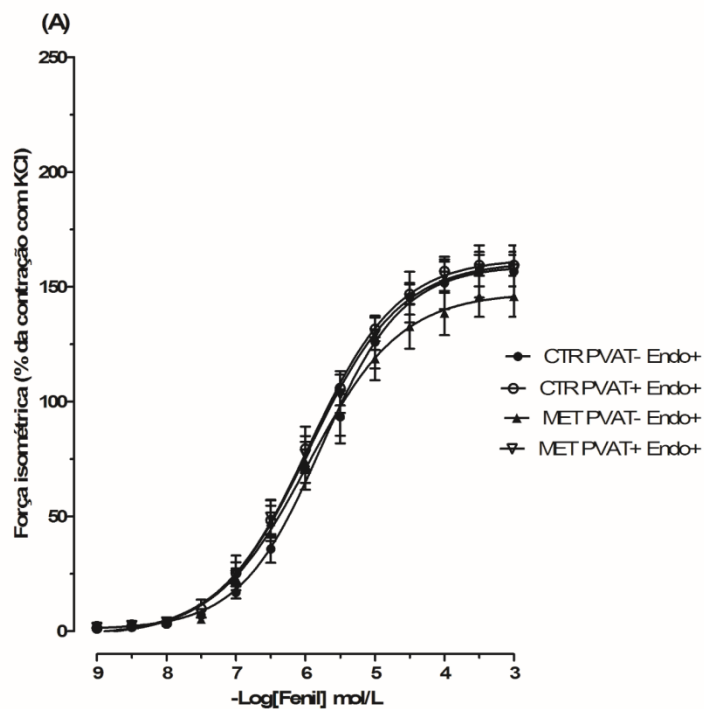
Fenil induziu contração concentração-dependente nos anéis isolados de ratos CTR e MET (Figura 1). Os resultados de R_{max} e pD_2 para Fenil nos grupos MET e CTR estão descritos na Tabela 2. Two-way ANOVA não indicou nenhuma diferença significativa na R_{max} [$F(1, 39)=0,384$, $p=0,539$] e pD_2 [$F(1, 39)=0,400$, $p=0,531$] para Fenil em anéis de aorta abdominal com endotélio na presença ou ausência de PVAT quando CTR e MET foram comparados. A remoção do endotélio aumentou a R_{max} na aorta abdominal dos grupos CTR e MET. A R_{max} [$F(1, 40)=0,005$, $p=0,946$] e pD_2 [$F(1, 40)=0,190$, $p=0,665$] para Fenil em anéis de aorta abdominal sem endotélio foi similar entre os grupos MET e CTR.

Tabela 2. Resposta máxima e pD2 (logaritmo negativo da concentração do agonista resultando em 50% da resposta máxima) para fenilefrina em anéis com (Endo+) e sem (Endo-) endotélio, na presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular.

	Resposta Máxima (% de contração do KCl)		pD2	
	PVAT+	PVAT-	PVAT+	PVAT-
Endo +				
CTR	155,86±9,25 [9]	154,12±8,36 [11]	6,00±0,14 [9]	5,78±0,13 [11]
MET	154,55±8,01 [12]	142,26±8,36 [11]	5,97±0,12 [12]	5,90±0,13 [11]
Endo -				
CTR	187,67±9,21 [11]	215,46±9,21 [11]	6,71±0,12 [11]	6,78±0,12 [11]
MET	180,24±8,82 [12]	206,77±9,66 [10]	6,86±0,11 [12]	6,83±0,12 [10]

Dados são representados como média ± E.P.M. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. Two-way ANOVA, $p > 0,05$. CTR: prole exposta à água durante o período gestacional; MET: prole exposta à metformina durante o período gestacional. PVAT+: presença de tecido adiposo perivascular. PVAT-: ausência de tecido adiposo perivascular. Endo+: com endotélio. Endo-: sem endotélio.

Figura 1. Curvas concentração efeito cumulativa para fenilefrina em anéis isolados com (Endo+; A) e sem (Endo-; B) endotélio, em presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular da prole masculina adulta exposta à metformina (MET) ou água (CTR) durante o período gestacional. Dados são expressos como média \pm E.P.M., $n = 9-12$. Two-way ANOVA, $p > 0,05$.



ACh e NPS induziram relaxamento concentração-dependente em todos os anéis aórticos avaliados (Figura 2 e 3, respectivamente). A Tabela 3 demonstra que não houve diferença significativa na Rmax [$F(1, 37)=0,005$, $p=0,945$] e pD2 [$F(1, 37)=1,733$, $p=0,196$] para ACh, assim como não houve diferença significativa na Rmax [$F(1, 35)=0,037$, $p=0,848$] e pD2 [$F(1, 35)=0,014$, $p=0,906$] para NPS (Tabela 4) entre os grupos CTR e MET.

Tabela 3. Resposta máxima e pD2 (logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima) para acetilcolina em anéis com endotélio, na presença (PVAT+) ou ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular.

	Resposta Máxima (%)		pD2	
	PVAT+	PVAT-	PVAT+	PVAT-
CTR	92,25±2,41 [10]	91,48±2,29 [11]	7,17±0,08 [10]	7,47±0,08 [11]
MET	92,15±2,41 [10]	91,71±2,41 [10]	6,98±0,08 [10]	7,50±0,08 [10]

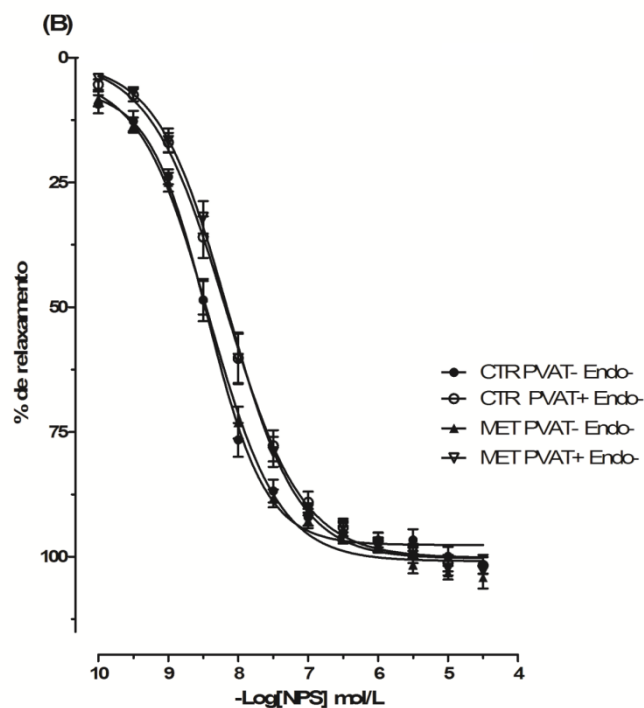
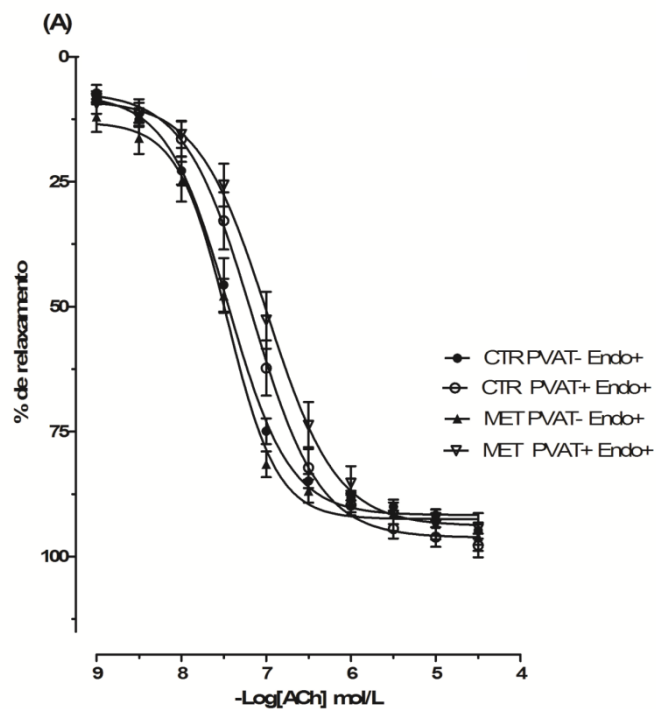
Dados são representados como média ± E.P.M. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. Two-way ANOVA, $p > 0,05$. CTR: prole exposta à água durante o período gestacional; MET: prole exposta à metformina durante o período gestacional. PVAT+: presença de tecido adiposo perivascular. PVAT-: ausência de tecido adiposo perivascular

Tabela 4. Resposta máxima e pD2 (logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima) para nitroprussiato de sódio em anéis sem endotélio, na presença (PVAT+) ou ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular.

	Resposta Máxima (%)		pD2	
	PVAT+	PVAT-	PVAT+	PVAT-
CTR	98,434±2,32 [10]	98,42±2,45 [9]	8,16±0,08 [10]	8,44±0,09 [9]
MET	100,52±2,32 [10]	101,42±2,32 [10]	8,14±0,08 [10]	8,40±0,08 [10]

Dados são representados como média ± E.P.M. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. Two-way ANOVA, $p > 0,05$. CTR: prole exposta à água durante o período gestacional; MET: prole exposta à metformina durante o período gestacional. PVAT+: presença de tecido adiposo perivascular. PVAT-: ausência de tecido adiposo perivascular.

Figura 2. Curvas concentração efeito cumulativa para acetilcolina (A) e nitroprussiato de sódio (B) em anéis aórticos isolados com (Endo+) e sem (Endo-) endotélio, na presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de tecido adiposo perivascular da prole masculina adulta exposta à metformina (MET) ou água (CTR) durante o período gestacional. Dados são expressos como média \pm E.P.M., $n = 9-12$. Two way ANOVA, $p > 0,05$.



5. DISCUSSÃO

Existem poucos trabalhos que avaliaram as consequências vasculares da exposição *in útero* na prole adulta (NOVI et al., 2017). Todavia há estudos mostrando efeitos diretos benéficos da metformina em humanos e animais (KATAKAM et al., 2000; JAGER et al., 2005; SUN et al., 2014; LEE et al., 2017). No presente estudo, foi demonstrado, pela primeira vez, que a exposição intrauterina à metformina não interfere com a reatividade da aorta abdominal para os vasodilatadores ACh e NPS, assim como não interfere com a resposta ao vasoconstritor Fenil, tanto na presença ou ausência de endotélio e PVAT. Além disso, foi observado que o tratamento com metformina durante a gestação não altera o ganho de peso materno, peso dos filhotes ao nascer, número de animais/ninhada e peso corpóreo da prole na vida adulta.

Nosso grupo recentemente demonstrou que a exposição intrauterina à metformina não interfere com a função endotelial da prole na aorta torácica (NOVI et al., 2017). Agora, foi demonstrado que a exposição à metformina *in útero* não altera com a função do endotélio e do PVAT na aorta abdominal isolada da prole masculina adulta, sugerindo que a exposição intrauterina à metformina é segura para o sistema vascular da prole.

Tem sido descrito que em pacientes com diabetes mellitus tipo II (DM II) tratados com insulina, o tratamento adicional com metformina resulta em melhora na concentração de marcadores plasmáticos de função endotelial (JAGER et al., 2005), assim como, no aumento da vasodilatação dependente de endotélio (MATHER; VERMA; ANDERSON, 2001). Do mesmo modo, em ratos Sprague-Dawley resistentes à insulina, o tratamento com metformina melhora a vasodilatação induzida pela ACh, tanto em experimentos *in vivo* como em experimentos *in vitro*, por meio de maior biodisponibilidade de NO (KATAKAM et al., 2000), indicando que o tratamento com esta biguanida exerce efeitos diretos benéficos sob a função vascular em humanos e modelos animais com diabetes.

A estreita relação de PVAT e função vascular tem sido destacada nos últimos anos. Interessantemente, o fenótipo na aorta abdominal é caracterizado por tecido adiposo branco, esta região parece ser mais pró-inflamatória e

aterogênica e apresenta maiores quantidades de genes inflamatórios e marcadores de infiltração de células imunes em relação à região torácica da aorta (PADILLA et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com metformina em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em frutose melhora a função endotelial regulando AMPK, SIRT-1 e inibindo a ativação de NF-kappa B no PVAT (SUN et al., 2014). Ainda, em ratos Sprague-Dawley sob dieta rica em lipídeos, a metformina melhora a função endotelial reduzindo a inflamação no PVAT mesentérico (LEE et al., 2017). Entretanto, os efeitos no PVAT da aorta da prole exposta à metformina *in útero* ainda não haviam sido elucidados. Neste presente estudo, foi demonstrado que a metformina não interfere na função endotelial e do PVAT na aorta abdominal isolada da prole exposta. Desta forma, a metformina exerce efeitos benéficos diretos na função vascular, como evidenciado em modelos de obesidade, e demonstra ser um fármaco seguro para o sistema cardiovascular da prole exposta.

O efeito da exposição maternal à metformina nos parâmetros antropométricos da progênie é controverso. Neste estudo, foi demonstrado que a metformina não afeta o peso da prole ao nascer, assim como na vida adulta. Em um estudo com humanos, o peso ao nascer não foi afetado nos recém-nascidos expostos à metformina *in útero*, por outro lado, os autores descrevem que as crianças expostas à metformina apresentam maior peso com um ano de idade quando comparadas com as crianças expostas ao placebo (CARLSEN; MARTINUSSEN; VANKY, 2012). Além disso, um estudo de *follow-up* realizado com mulheres com diabetes gestacional tratadas com metformina ou insulina mostrou que as crianças expostas à metformina no período pré-natal foram mais altas e apresentaram maior peso aos 18 meses de idade do que as crianças expostas à insulina (IJÄS et al., 2015). Em roedores, foi descrito que a exposição à metformina *in útero* predispõe a prole à obesidade, quando alimentada com dieta rica em lipídeos, mas não com dieta regular (SALOMÄKI et al., 2013). Os períodos pré-natal e neonatal são críticos para o desenvolvimento do equilíbrio energético e circuitos metabólicos (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004; YURA et al., 2005), desta forma, a predisposição a um ambiente atípico durante estes períodos pode resultar em mudanças

sustentadas no fenótipo (YURA et al., 2005; MEANEY; SZYF; SECKL, 2007; VICKERS et al., 2008; CARONE et al., 2010; SALOMÄKI et al., 2013). Por conseguinte, o “status” metabólico materno durante a gestação e o “status” metabólico da prole durante seu desenvolvimento apresentam importante papel em como a exposição à metformina irá se traduzir no fenótipo da prole (SALOMÄKI et al., 2014). Os resultados divergentes descritos pelos estudos que avaliaram as consequências da exposição intrauterina à metformina podem ser devido a diferenças metodológicas, como uma pré-condição gestacional (presença ou não de alteração metabólica), dose de tratamento da metformina, tempo de tratamento e idade na qual os parâmetros metabólicos foram avaliados na prole.

No que diz respeito aos efeitos no ganho de peso materno, foi demonstrado que a metformina não interferiu neste parâmetro, sendo o resultado um pouco surpreendente, pois este regime de exposição foi utilizado em outros estudos onde uma leve diminuição no ganho de peso materno durante a gestação foi observado (FORCATO et al., 2017; NOVI et al., 2017). Semelhante ao presente estudo, em camundongos C57/BL6NHsd prenhez sob dieta regular e sem alteração metabólica durante a gestação, o tratamento com metformina também não interfere no peso materno (SALOMÄKI et al., 2013). Ademais, mulheres com diabetes gestacional também podem não apresentar alteração no peso corporal com o tratamento de metformina (TERTTI et al., 2008; IJÄS et al., 2011). Todavia, os efeitos da metformina sob este parâmetro não são inteiramente claros, visto que existem estudos demonstrando que mulheres com diabetes gestacional tratadas com metformina tiveram menor ganho de peso que àquelas tratadas com insulina (BALANI et al., 2009; SPAULONCI et al., 2013). Em resumo, foi demonstrado no presente estudo que a exposição à metformina durante a gestação não induziu toxicidade materna e neonatal. Além disso, foi demonstrado que a exposição intrauterina à metformina não levou a mudanças na reatividade da aorta abdominal prole masculina adulta.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que a exposição intrauterina à metformina não exerceu efeito intrínseco sobre a função do endotélio e do PVAT na aorta abdominal na prole, mostrando ser segura ao sistema vascular da prole exposta.

REFERÊNCIAS

ALMABROUK, T. A. M.; EWART, M. A.; SALT, I. P.; KENNEDY, S. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 3, p. 595–617, fev. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12479>>.

ARTWOHL, M.; RODEN, M.; WALDHÄUSL, W.; FREUDENTHALER, A.; BAUMGARTNER-PARZER, S. M. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 146–8, 20 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-0301fje>>.

BALANI, J.; HYER, S. L.; RODIN, D. A.; SHEHATA, H. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes treated with metformin or insulin: a case-control study. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 26, n. 8, p. 798–802, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709150>>.

BARKER, D. J. .; OSMOND, C.; WINTER, P. .; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S. . WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, set. 1989. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(89\)90710-1/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(89)90710-1/abstract)>.

BARKER, D. J. P. The Wellcome Foundation Lecture, 1994. The Fetal Origins of Adult Disease. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 262, n. 1363, p. 37–43, 23 out. 1995. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1995.0173>>.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5667, p. 108–10, 2 abr. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1095004>>.

CARLSEN, S. M.; MARTINUSSEN, M. P.; VANKY, E. Metformin's Effect on First-Year Weight Gain: A Follow-up Study. **PEDIATRICS**, v. 130, n. 5, p. e1222–e1226, 1 nov. 2012. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-0346>>.

CARONE, B. R.; FAUQUIER, L.; HABIB, N.; SHEA, J. M.; CAROLINE, E.; LI, R.; BOCK, C.; LI, C.; ZAMORE, P. D.; WENG, Z.; HOFMANN, H. A.; FRIEDMAN, N.; RANDO, O. J. Paternally-induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. **Cell**, v. 143, n. 7, p. 1084–1096, 2010.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

CERAVOLO, G. S.; FILGUEIRA, F. P.; COSTA, T. J.; LOBATO, N. S.; CHIGNALIA, A. Z.; ARAUJO, P. X.; TOSTES, R. C.; DANTAS, A. P.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341–346, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.018>>.

CHARLES, B.; NORRIS, R.; XIAO, X.; HAGUE, W. Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. **Therapeutic drug monitoring**, v. 28, n. 1, p. 67–72, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418696>>.

CHEN, H.; KASSAB, G. S. Microstructure-based biomechanics of coronary arteries in health and disease. **Journal of Biomechanics**, v. 49, n. 12, p. 2548–2559, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28299348>>.

CHO, N. H.; COLAGIURI, S.; JOVANOVIĆ, L.; MOSES, R.; SCHMIDT, M. I. Global Guideline: pregnancy and diabetes. **International diabetes federation**, 2009.

CITTADINI, A.; NAPOLI, R.; MONTI, M. G.; REA, D.; LONGOBARDI, S.; NETTI, P. A.; WALSER, M.; SAMA, M.; AIMARETTI, G.; ISGAARD, J.; SACCA, L. Metformin Prevents the Development of Chronic Heart Failure in the SHHF Rat Model. **Diabetes**, v. 61, n. 4, p. 944–953, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db11-1132>>.

COOL, B.; ZINKER, B.; CHIOU, W.; KIFLE, L.; CAO, N.; PERHAM, M.; DICKINSON, R.; ADLER, A.; GAGNE, G.; IYENGAR, R.; ZHAO, G.; MARSH, K.; KYM, P.; JUNG, P.; CAMP, H. S.; FREVERT, E. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 403–416, 2006.

DAGHER, Z.; RUDERMAN, N.; TORNHEIM, K.; IDO, Y. The Effect of AMP-Activated Protein Kinase and Its Activator AICAR on the Metabolism of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 1, p. 112–115, nov. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X99916352>>.

DE BRITO OLIVEIRA COSTA, E.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125, 24 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/5142>>.

DZAMKO, N. L.; STEINBERG, G. R. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 1, p. 115–127, 2009.

EPA. Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW 3/4 as Default Method in Derivation of the Oral RfD. n. 68, p. 1–34, 2006.

EYAL, S.; EASTERLING, T. R.; CARR, D.; UMANS, J. G.; MODOVNIK, M.; HANKINS, G. D. V.; CLARK, S. M.; RISLER, L.; WANG, J.; KELLY, E. J.; SHEN, D. D.; HEBERT, M. F. Pharmacokinetics of metformin during pregnancy. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 5, p. 833–840, 2010.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143–153, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1279>>.

FORCATO, S.; NOVI, D. R. B. da S.; COSTA, N. O.; BORGES, L. I.; GÓES, M. L. M. de; CERAVOLO, G. S.; GERARDIN, D. C. C. In utero and lactational exposure to metformin induces reproductive alterations in male rat offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 74, p. 48–58, dez. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.023>>.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 9, p. 2007–18, jul. 1989.

GIL-ORTEGA, M.; SOMOZA, B.; HUANG, Y.; GOLLASCH, M.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S. Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 7, p. 367–375, jul. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104327601500082X>>.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BUKLIJAS, T.; LOW, F. M.; BEEDLE, A. S. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 401–8, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2009.102>>.

GLUECK, C. J.; WANG, P.; GOLDENBERG, N.; SIEVE-SMITH, L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 11, p. 2858–64, nov. 2002.

HARDIE, D. G. Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase: A Central Regulator of Metabolism with Roles in Diabetes, Cancer, and Viral Infection. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 76, p. 155–164, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071265>>.

HENIN, N.; VINCENT, M.-F.; GRUBER, H. E.; BERGHE, G. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. **Faseb J**, v. 9, n. 7, p. 541–546, 1995.

HIGASHI, C. M.; MATSUMOTO, A. K.; GAMEIRO, J. G.; MOURA, K. F.; HIGACHI, L.; OLIVEIRA, L. C.; BARBOSA, D. S.; MOREIRA, E. G.; CERAVOLO, G. S. Does fish oil or folic acid prevent vascular changes in female progeny caused by maternal exposure to fluoxetine? **Life Sciences**, v. 152, p. 165–170, 2016.

HUNDAL, H. S.; RAMLAL, T.; REYES, R.; LEITER, L. A.; KLIP, A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1165–73, set. 1992. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.131.3.1505458>>.

IDO, Y.; CARLING, D.; RUDERMAN, N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 159–67, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756336>>.

IJÄS, H.; VÄÄRÄSMÄKI, M.; MORIN-PAPUNEN, L.; KERAVUO, R.; EBELING, T.; SAARELA, T.; RAUDASKOSKI, T. Metformin should be considered in the treatment of gestational diabetes: a prospective randomised study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 118, n. 7, p. 880–885, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083860>>.

IJÄS, H.; VÄÄRÄSMÄKI, M.; SAARELA, T.; KERAVUO, R.; RAUDASKOSKI, T. A follow-up of a randomised study of metformin and insulin in gestational diabetes mellitus: growth and development of the children at the age of 18 months. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 7, p. 994–1000, jun. 2015.

JAGER, J.; KOOY, A.; LEHERT, P.; BETS, D.; WULFFELE, M. G.; TEERLINK, T.; SCHEFFER, P. G.; SCHALKWIJK, C. G.; DONKER, A. J. M.; STEHOUWER, C. D. A. Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 1, p. 100–109, jan. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2004.01420.x>>.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 4, p. 253–62, 17 abr. 2007. Disponível em: <<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2011.125>>.

JOHNSON, N. Metformin is a reasonable first-line treatment option for non-obese women with infertility related to anovulatory polycystic ovary syndrome--a meta-analysis of randomised trials. **The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology**, v. 51, n. 2, p. 125–9, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466513>>.

KATAKAM, P. V.; UJHELYI, M. R.; HOENIG, M.; MILLER, A. W. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 108–112, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642283>>.

LEE, H. J.; CANTÚ, S. M.; DONOSO, A. S.; CHOI, M. R.; PEREDO, H. A.; PUYÓ, A. M. Metformin prevents vascular prostanoid release alterations induced by a high-fat diet in rats. **Autonomic & autacoid pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 37–43, jun. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/aap.12057>>.

LOBATO, N. S.; FILGUEIRA, F. P.; HAGIHARA, G. N.; AKAMINE, E. H.; PARIZ, J. R.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z. B. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. **Life sciences**, v. 90, n. 5–6, p. 228–35, 30 jan. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.11.005>>.

LOCHHEAD, P. A.; SALT, I. P.; WALKER, K. S.; HARDIE, D. G.; SUTHERLAND, C. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCCK and glucose-6- phosphatase. **Diabetes**, v. 49, n. 6, p. 896–903, 2000.

MATHER, K. J.; VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 5, p. 1344–50, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11300445>>.

MATTAGAJASINGH, I.; KIM, C.-S.; NAQVI, A.; YAMAMORI, T.; HOFFMAN, T. A.; JUNG, S.-B.; DERICCO, J.; KASUNO, K.; IRANI, K. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14855–14860, 11 set. 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0704329104>>.

MATTHAEI, S.; HAMANN, A.; KLEIN, H. H.; BENECKE, H.; KREYMANN, G.; FLIER, J. S.; GRETEN, H. Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. **Diabetes**, v. 40, n. 7, p. 850–857, 1 jul. 1991. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.40.7.850>>.

MEANEY, M. J.; SZYF, M.; SECKL, J. R. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 269–277, jul. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491407000871>>.

MORIN-PAPUNEN, L.; RANTALA, A. S.; UNKILA-KALLIO, L.; TIITINEN, A.; HIPPELÄINEN, M.; PERHEENTUPA, A.; TINKANEN, H.; BLOIGU, R.; PUUKKA, K.; RUOKONEN, A.; TAPANAINEN, J. S. Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 97, n. 5, p. 1492–500, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419702>>.

MOSS, T. J.; WALLRATH, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 618, n. 1–2, p. 163–174, maio 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1892579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NAGATA, D.; MOGI, M.; WALSH, K. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Signaling in Endothelial Cells Is Essential for Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31000–31006, 15 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M300643200>>.

NEVES, M. F.; KASAL, D. A. B.; CUNHA, A. R.; MEDEIROS, F. Vascular Dysfunction as Target Organ Damage in Animal Models of Hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijhy/2012/187526/>>.

NINOMIYA, O. H.; TAVARES MONTEIRO, J. A.; HIGUCHI, M. D. L.; PUECH-LEÃO, P.; DE LUCCIA, N.; RAGHAVAN, M. L.; DA SILVA, E. S. Biomechanical Properties and Microstructural Analysis of the Human Nonaneurysmal Aorta as a Function of Age, Gender and Location: An Autopsy Study. **Journal of Vascular Research**, v. 52, n. 4, p. 257–264, 2015. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/442979>>.

NOVI, D. R. B. S.; FORCATO, S.; VIDIGAL, C. B.; LOIOLA, G. H.; GERARDIN, D. C. C.; CERAVOLO, G. S. Metformin Exposure During Pregnancy And Lactation Did Not Cause Vascular Reactivity Alteration In Adult Male Offspring. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, p. 1, jul. 2017. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00005344-9000000000-98683>>.

OUCHI, N. AMP-Activated Protein Kinase Signaling Stimulates VEGF Expression and Angiogenesis in Skeletal Muscle. **Circulation Research**, v. 96, n. 8, p. 838–846, 17 mar. 2005. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000163633.10240.3b>>.

OWEN, M. R.; DORAN, E.; HALESTRAP, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **The Biochemical journal**, v. 348 Pt 3, p. 607–14, 15 jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839993>>.

PADILLA, J.; JENKINS, N. T.; VIEIRA-POTTER, V. J.; LAUGHLIN, M. H. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 7, p. R543–R552, 2013. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00567.2012>>.

POLICE, S. B.; THATCHER, S. E.; CHARNIGO, R.; DAUGHERTY, A.; CASSIS, L. A. Obesity Promotes Inflammation in Periaortic Adipose Tissue and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 10, p. 1458–1464, 1 out. 2009. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.109.192658>>.

POTENTE, M.; GHAENI, L.; BALDESSARI, D.; MOSTOSLAVSKY, R.; ROSSIG, L.; DEQUIEDT, F.; HAENDELER, J.; MIONE, M.; DEJANA, E.; ALT, F. W.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. **Genes & Development**, v. 21, n. 20, p. 2644–2658, 15 out. 2007. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.435107>>.

RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 7, p. 349–353, 12 ago. 1976. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197608122950701>>.

RODENHISER, D. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174, n. 3, p. 341–348, 31 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.cmaj.ca/cgi/doi/10.1503/cmaj.050774>>.

RUDERMAN, N. B.; JULIA XU, X.; NELSON, L.; CACICEDO, J. M.; SAHA, A. K.; LAN, F.; IDO, Y. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 4, p. E751–E760, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00745.2009>>.

SALOMÄKI, H.; HEINÄNIEMI, M.; VÄHÄTALO, L. H.; AILANEN, L.; EEROLA, K.; RUOHONEN, S. T.; PESONEN, U.; KOULU, M. Prenatal metformin exposure in a maternal high fat diet mouse model alters the transcriptome and modifies the metabolic responses of the offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2014.

SALOMÄKI, H.; VÄHÄTALO, L. H.; LAURILA, K.; JÄPPINEN, N. T.; PENTTINEN, A.-M.; AILANEN, L.; ILYASIZADEH, J.; PESONEN, U.; KOULU, M. Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56594, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457588>>.

SARA W. REECE, HARISH S. PARIHAR, C. L. Metformin in Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Spectrum**, v. 27, n. 4, p. 289–295, 2014.

SCHIMMACK, G.; DEFRONZO, R. A.; MUSI, N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 591–602, 2006.

SENA, C. M.; MATAFOME, P.; LOURO, T.; NUNES, E.; FERNANDES, R.; SEIÇA, R. M. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 424–437, 2011.

SINCLAIR, K. D.; LEA, R. G.; REES, W. D.; YOUNG, L. E. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, n. April 2016, p. 425–43, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17491163>>.

SPAULONCI, C. P.; BERNARDES, L. S.; TRINDADE, T. C.; ZUGAIB, M.; FRANCISCO, R. P. V. Randomized trial of metformin vs insulin in the management of gestational diabetes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 209, n. 1, p. 34.e1-34.e7, jul. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937813002962>>.

STEINBERG, H. O.; PARADISI, G.; HOOK, G.; CROWDER, K.; CRONIN, J.; BARON, A. Free Fatty Acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 1231–1238, 2000.

STUMVOLL, M.; NURJHAN, N.; PERRIELLO, G.; DAILEY, G.; GERICH, J. E. Metabolic Effects of Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 9, p. 550–554, 31 ago. 1995. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199508313330903>>.

SUN, Y.; LI, J.; XIAO, N.; WANG, M.; KOU, J.; QI, L.; HUANG, F.; LIU, B.; LIU, K. Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. **Pharmacological Research**, v. 89, p. 19–28, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.07.006>>.

SZASZ, T.; BOMFIM, G. f.; WEBB. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vascular Health and Risk Management**, v. 9, p. 105, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/the-influence-of-perivascular-adipose-tissue-on-vascular-homeostasis-peer-reviewed-article-VHRM>>.

SZASZ, T.; WEBB, R. C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clinical Science**, v. 122, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2012. Disponível em: <<http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20110151>>.

TERTTI, K.; EKBLAD, U.; VAHLBERG, T.; RÖNNEMAA, T. Comparison of Metformin and Insulin in the Treatment of Gestational Diabetes: A Retrospective, Case-Control Study. **The Review of Diabetic Studies**, v. 5, n. 2, p. 95–101, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18795211>>.

VANKY, E.; ZAHLESEN, K.; SPIGSET, O.; CARLSEN, S. M. Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 5, p. 1575–8, maio 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001502820500141X>>.

VICKERS, M. H.; GLUCKMAN, P. D.; COVENY, A. H.; HOFMAN, P. L.; CUTFIELD, W. S.; GERTLER, A.; BREIER, B. H.; HARRIS, M. The Effect of Neonatal Leptin Treatment on Postnatal Weight Gain in Male Rats Is Dependent on Maternal Nutritional Status during Pregnancy. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1906–1913, abr. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2007-0981>>.

VICTORIO, J. A.; FONTES, M. T.; ROSSONI, L. V.; DAVEL, A. P. Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. JUL, p. 295, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00295/abstract>>.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; LECLERC, J.; HÉBRARD, S.; LANTIER, L.; MOUNIER, R.; ANDREELLI, F.; FORETZ, M. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: From physiology to therapeutic perspectives. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 1, p. 81–98, 2009.

YURA, S.; ITOH, H.; SAGAWA, N.; YAMAMOTO, H.; MASUZAKI, H.; NAKAO, K.; KAWAMURA, M.; TAKEMURA, M.; KAKUI, K.; OGAWA, Y.; FUJII, S. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 6, p. 371–378, jun. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413105001439>>.

ZHANG, Y. AMP-Activated Protein Kinase Is Involved in Endothelial NO Synthase Activation in Response to Shear Stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1281–1287, 1 jun. 2006. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000221230.08596.98>>.

ZHAO, L.-P.; SHENG, X.-Y.; ZHOU, S.; YANG, T.; MA, L.-Y.; ZHOU, Y.; CUI, Y.-M. Metformin versus insulin for gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 1224–1234, nov. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bcp.12672>>.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; MOLLER, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167–74, out. 2001. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/13505>>.

ZOU, M. H.; KIRKPATRICK, S. S.; DAVIS, B. J.; NELSON, J. S.; WILES IV, W. G.; SCHLATTNER, U.; NEUMANN, D.; BROWNLEE, M.; FREEMAN, M. B.; GOLDMAN, M. H. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo: Role of mitochondrial reactive nitrogen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 43940–43951, 2004.

ANXOS

Anexo A

Parecer do Comitê de Ética e uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 138/2015

Londrina, 03 de Julho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Influência da exposição materna à metformina sobre parâmetros reprodutivos, metabólicos e cardiovasculares na prole de ratos", registrado sob o processo CEUA nº 6996.2015.02, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 100 ratos Wistar (40 machos e 60 fêmeas), com 75 dias de idade e provenientes do Biotério Central da UEL, e a partir do cruzamento de parte destes, espera-se obter aproximadamente 400 filhotes. O projeto tem como objetivo avaliar em ratos e ratas expostos à metformina durante a gestação e a amamentação os parâmetros reprodutivos e comportamentais, o fenótipo metabólico, a pressão arterial e frequência cardíaca, responsividade da aorta e a produção de espécies reativas de oxigênio na aorta. Para tanto, será colocado um macho e duas fêmeas em cada gaiola para o acasalamento e a prenhez será determinada quando observados espermatozoides e a fase estro a partir da realização do esfregaço vaginal. A partir da determinação da prenhez, as ratas serão alocadas em gaiolas individuais e divididas em grupos experimentais para tratamento com metformina e água em doses e tempos variáveis de acordo com o grupo experimental. As proles também serão divididas em grupos de acordo com o tratamento que suas respectivas gerações parentais receberam para avaliação da toxicidade materna, toxicidade reprodutiva na prole feminina e masculina e parâmetros metabólicos e cardiovasculares. Os animais serão eutanasiados com tiopental (40 mg/kg, i.p.) e será realizada toracotomia para remoção do sangue por punção cardíaca e das porções torácica e abdominal da aorta, que serão separadas, dissecadas e seccionadas em dois anéis transversais. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Ep. Verra Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verra Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Illa. Sra.

Profa. Dra. Graziela Scallanti Ceravolo

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.