



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLA REGINA BARRIONUEVO DA SILVA NOVI

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO MATERNA À METFORMINA
SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS E
CARDIOVASCULARES NA PROLE DE RATOS**

Londrina
2017

DANIELLA REGINA BARRIONUEVO DA SILVA NOVI

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO MATERNA À METFORMINA
SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS E
CARDIOVASCULARES NA PROLE DE RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo

Londrina
2017

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

Calsavara, Larissa Corsini.

Variações de diversidade funcional de aves em áreas perturbadas de floresta com Araucária / Larissa Corsini Calsavara. - Londrina, 2016.
71 f. : il.

Orientador: Marcos Robalinho Lima.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Diversidade funcional - Teses. 2. Aves - Teses. 3. Floresta Ombrófila Mista - Teses. 4. Perturbação da vegetação - Teses. I. Robalinho Lima, Marcos . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

DANIELLA REGINA BARRIONUEVO DA SILVA NOVI

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO MATERNA À METFORMINA SOBRE
OS PARÂMETROS METABÓLICOS E CARDIOVASCULARES NA
PROLE DE RATOS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Suplentes

Profa. Dra. Andressa de Freitas Mendes
Dionísio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve me capacitando, me orientando e sendo o meu grande alicerce.

Ao meu esposo Lucas e aos meus familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar e a lutar pelos meus sonhos e realização profissional.

A minha orientadora, Professora Graziela, pela dedicação, orientação e ensinamento durante todo o mestrado.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório: Bruno, Camila, Carolina, Gabriela, Guilherme, Kawane, Rafaela, Deborah e Weslei.

A colega e colaboradora desse trabalho, Simone que se tornou uma grande amiga, que juntas pudemos compartilhar todas as dificuldades e conquistas durante a execução desse trabalho.

A Prof^a Marli e a doutoranda Hiviny pela colaboração para realização desse trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas de departamento, pela convivência e compartilhamento de conhecimentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

NOVI, Daniella Regina Barrionuevo da Silva. **Influência da exposição materna à metformina sobre os parâmetros metabólicos e cardiovasculares na prole de ratos**. 2017. 38 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A metformina (MET) é uma biguanida utilizada no tratamento de diabetes tipo 2, diabetes gestacional, resistência à insulina e síndrome do ovário policístico. Embora atravesse a placenta e tenha sido detectada no cordão umbilical em concentrações iguais às do sangue materno, é considerado um medicamento seguro durante toda a gestação por não ser teratogênico. Devido à escassez de estudos que avaliem os efeitos cardiovasculares e metabólicos da exposição à MET, o objetivo desse estudo foi avaliar se a exposição intrauterina e lactacional à metformina poderiam causar essas alterações na prole adulta. Ratas Wistar foram tratadas com MET 293mg/kg/dia por gavagem do dia gestacional (DG) 0 ao DG 21 (METG) ou do DG 0 até o dia pós-natal (DPN) 21 (METGL). Os grupos controles receberam água por gavagem nos mesmos períodos (CTRG e CTRGL). Foi avaliada na prole masculina adulta (75 dias) a reatividade de anéis de aorta para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS). Na prole feminina e masculina adulta (75 dias) foi realizado a avaliação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC); o teste de tolerância à insulina; o índice de Lee e o peso de gorduras. Os resultados na aorta demonstraram que a contração induzida pela Fenil e o relaxamento induzido pela ACh, assim como, para o NPS foi similar entre os grupos. A PAM de machos e fêmeas adultos expostos à MET foi similar aos seus controles. A FC de fêmeas expostas à metformina no período gestacional e lactacional (GL) estava aumentada em relação ao seu controle, enquanto que nos machos e nas fêmeas expostas somente durante a gestação a FC foi similar as dos seus respectivos controles. A constante de decaimento da glicose (kITT), os níveis glicêmicos basais, o peso corpóreo e índice de Lee de machos e fêmeas expostos a MET (G e GL) foram similares aos grupos controles (G e GL). Quanto à composição corporal, as fêmeas METG tiveram redução da gordura perigonadal e os machos (METGL) apresentaram redução da gordura retroperitoneal. Dessa forma, é possível concluir que a exposição à metformina durante a gestação e lactação foi segura para as mães e para os filhotes e esta exposição provavelmente não programa disfunção endotelial ou alterações metabólicas para a prole adulta exposta.

Palavras-chave: Metformina. Tratamento materno. Reatividade da aorta. Parâmetros cardiovasculares. Parâmetros metabólicos.

NOVI, Daniella Regina Barrionuevo da Silva. Influence of maternal exposure to metformin on metabolic and cardiovascular parameters in offspring of rats. 2017. 38 p. Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Metformin (MET) is a biguanide used to treat type 2 diabetes, gestational diabetes, insulin resistance and polycystic ovary syndrome. Although the MET crosses the placenta and has been detected in the umbilical cord at concentrations equal to the maternal blood, it is considered a safe drug throughout pregnancy. Due to scarcity of studies evaluating the metabolic and cardiovascular alterations of exposure to MET, the aim this study was to evaluate if maternal exposure to MET during pregnancy and lactation could cause metabolic and cardiovascular alterations on adult offspring. Wistar female rats were treated with MET 293mg/kg/day, by gavage from gestational day (GD) 0 to the GD 21 (METG) or GD 0 until post natal day (PND) 21 (METGL). Control dams received water by gavage at the same periods (CTRG and CTRGL). It was evaluated in male offspring (75 days) the aortic reactivity to phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh) and sodium nitroprussiate (SNP). In adult male and female (75 days) were evaluated the blood pressure mean (BPM) and heart rate (HR); the insulin tolerance and obesity parameters. The results demonstrated that the contraction induced by Phe and the relaxation induced by ACh, as well as, to SNP were similar among groups. BPM of adult male and female exposed to MET was similar to their controls. The HR of female METGL was increased when compared to CTRGL, while in adult male the HR was similar to their respective controls. The constant rate for blood glucose decay (kITT), basal glycemic levels, body weight and Lee index of male and female exposed to MET were similar to control groups. In relation to body composition, female METG had perigonadal fat pad reduction and male METGL presented reduction of retroperitoneal fat pad deposition. Altogether, it is possible to conclude that exposure to MET during gestational and lactation periods was safe for dams and offspring and this exposure probably does not program endothelial dysfunction and metabolic alterations in adult offspring.

Key-words: Metformin. Maternal treatment. Aortic reactivity. Cardiovascular parameters. Metabolic parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros biológicos avaliados nas mães e nas proles expostas à metformina (MET) ou água (CTR)19
Figura 1.	Consumo de ração (g) das mães expostas à metformina ou água20
Tabela 2.	Resposta máxima e pD ₂ (logaritmo negativo da concentração do agonista em 50% da resposta máxima) em anéis de aorta com (E +) e sem endotélio (E -)21
Figura 2.	Curvas concentração-efeito cumulativa para fenilefrina em anéis de aorta com (E+) e sem (E -) endotélio.....22
Tabela 3.	Resposta máxima e pD ₂ (logaritmo negativo da concentração do fármaco em 50% da resposta máma) em anéis de aorta com e sem endotélio para acetilcolina e nitroprussiato de sódio23
Figura 3.	Curvas concentração-efeito cumulativa para acetilcolina, na presença de endotélio, e nitroprussiato de sódio obtidos em anéis aórticos sem endotélio24
Tabela 4.	Parâmetros cardiovasculares avaliados em machos e fêmeas adultos expostos à metformina (MET) ou água (CTR)25
Figura 4.	Teste de tolerância à insulina para a prole masculina e feminina27
Tabela 5.	Avaliação da obesidade da prole masculina e feminina adulta e glicemia basal28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AMPK	Proteína quinase ativada pelo AMP
AUC	Área sob a curva
CCE	Curva concentração efeito-cumulativa
CTRG	Controle gestacional
CTRGL	Controle gestacional e lactacional
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
E+	Endotélio preservado
E-	Endotélio removido
EDCF	Fatores contráteis derivados do endotélio
EDRF	Fatores relaxantes derivados do endotélio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fenil	Fenilefrina
FC	Frequência cardíaca
ITT	Teste de tolerância à insulina
kITT	constante de decaimento da glicose
METG	Metformina gestacional
METGL	Metformina gestacional e lactacional
n	Número de animais por grupo
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAM	Pressão arterial média
pD2	Logaritmo negativo da concentração efetiva em 50% da resposta máxima
Rmax	Resposta máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.1.2	Objetivos específicos	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Animais e tratamento	14
3.2	Avaliação dos Parâmetros Cardiovasculares	15
3.2.1	Avaliação da reatividade da aorta torácica isolada a agentes vasoconstritores e vasodilatadores	15
3.2.2	Avaliação da frequência cardíaca e pressão arterial média	16
3.3	Avaliação dos Parâmetros Metabólicos	17
3.3.1	Teste de tolerância à insulina	17
3.3.2	Avaliação da obesidade	17
3.4	Análise Estatística	18
4	RESULTADOS	18
4.1	Parâmetros materno e dos neonatos	18
4.2	Reatividade da aorta, PAM e FC	21
4.3	Parâmetros metabólicos	26
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
	ANEXO	38

1 INTRODUÇÃO

Estudos durante a década de 1980 estabeleceram o princípio de que a incidência de certas doenças em adultos, tais como acidente vascular cerebral, diabetes tipo 2 e dislipidemia, podem estar ligadas ao desenvolvimento intrauterino. Esse princípio mais tarde, foi chamado de “Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença” ou DOHaD (“Developmental Origins of Health and Disease”) e baseia-se na percepção de que eventos que ocorrem durante o desenvolvimento do organismo, como a presença de doenças durante a gestação ou exposição materna a fármacos, podem influenciar tardiamente a saúde do indivíduo. A hipótese da DOHaD está baseada no fato de que as influências ambientais durante o desenvolvimento fetal e pós-natal podem levar a mudanças estáveis no epigenoma e alterar a susceptibilidade do indivíduo a doenças crônicas cardiovasculares e metabólicas. Assim, o epigenoma de cada linhagem celular carrega o registro de sua história de desenvolvimento, sustentando as origens do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (GLUCKMAN et al., 2009; SINCLAIR, KD; LEA, RG; REES, WD; YOUNG, 2007).

Metformina é uma biguanida utilizada para tratar resistência à insulina, diabetes melitus tipo 2, síndrome do ovário policístico e diabetes gestacional (GLUECK et al., 2002; VIOLLET et al., 2012). Mulheres tratadas com este fármaco antes da gestação em geral continuam o uso após engravidarem (JOHNSON, 2011; MORIN-PAPUNEN et al., 2012) sendo então classificado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como uma droga de categoria B, ou seja, não existem estudos suficientes em gestantes, no entanto, estudos em animais não demonstram ser teratogênico.

Como alternativa terapêutica, medicações orais, como a metformina, mostram-se de efetividade comparável à insulina (LANGER et al., 2000; ROWAN et al., 2008), sendo de maior aceitação pelos pacientes por sua administração ser mais confortável que uma via parenteral, por serem menos dispendiosas e, no caso da metformina, por não acarretar ganho indesejado de peso. Além disso, a metformina é recomendada pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009) e Federação Internacional de Diabetes (CHO et al., 2009) para tratamento de diabetes gestacional.

Embora a metformina atravesse a placenta (KOVO et al., 2008) e tenha sido detectada no cordão umbilical em concentrações iguais as do sangue materno (GLUECK et al., 2008), sabe-se que esta droga não é teratogênica (BALANI; HYER; RODIN, 2009; BOLTON et al., 2009; GUTZIN; KOZER; MAGEE, 2003). Segundo *National Institute for Health and Clinical Excellence*, a metformina é considerada um

medicamento seguro durante toda a gestação, inclusive no primeiro trimestre (GILBERT; VALOIS; KOREN, 2006). Além disso, estudos demonstram que a metformina é transferida para o recém-nascido pelo leite materno, porém em concentrações muito baixas não causando toxicidade no lactente (GLATSTEIN et al., 2009).

O principal mecanismo de ação da metformina é reduzir a produção de glicose hepática, através da inibição da gliconeogênese e da glicogenólise e estimulação da glicogênese e aumentar a captação de glicose induzida pela insulina no músculo esquelético, por aumentar expressão de hexoquinase muscular e de transportadores de glicose (Glut4) (HOLMES; WINDER, 1999). Além disso, este fármaco reduz os níveis plasmáticos de triglicerídeos e ácidos graxos livres (HAWLEY et al., 2002; VIOLLET et al., 2012). Esses mecanismos são mediados pela estimulação da proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK), um regulador energético celular que ativa as vias metabólicas produtoras de ATP, no músculo esquelético e fígado (LONG; ZIERATH, 2006; STEINBERG; KEMP, 2009; ZHOU et al., 2001). Estudos também têm sugerido que a metformina aumente a expressão de SIRT1 (Sirtuin 1), um regulador metabólico celular, através de uma via independente de AMPK (HUNG et al., 2016; KUGEL; MOSTOSLAVSKY, 2013). Sabe-se ainda que a SIRT1 promove relaxamento vascular dependente do endotélio por ativação da óxido nítrico sintase (MATTAGAJASINGH et al., 2007).

A progênie de mulheres diabéticas apresenta ao nascer aumento de massa corpórea, aumento ectópico de gordura subcutânea e resistência à insulina e à leptina (ALI et al., 2011; CATALANO et al., 2009). De maneira semelhante, filhos de mulheres obesas ou com síndrome do ovário policístico apresentam aumento de gordura visceral e resistência à insulina ao nascer (CATALANO et al., 2009). Entretanto, ainda não está claro se a exposição intrauterina à metformina pode resultar em benefícios metabólicos para prole de mães obesas e diabéticas (ALI et al., 2011; KLÖTING et al., 2010; SCARPELLO; HOWLETT, 2008).

Em um estudo aleatorizado, realizado em mulheres com diabetes gestacional foi demonstrado que a exposição intrauterina à metformina não altera o crescimento de crianças expostas. Entretanto, estas crianças apresentam melhor distribuição de gordura subcutânea, sem alteração de gordura visceral, quando comparadas com crianças que foram expostas à insulina (BONEY et al., 2005). Os autores consideram este efeito da metformina benéfico, uma vez que, o diabetes gestacional tende a reduzir a gordura subcutânea e aumentar o depósito de gordura visceral na prole, o que facilita o desenvolvimento de resistência à insulina e obesidade (BONEY et al., 2005). Por outro lado, foi demonstrado que crianças expostas à metformina durante a

gestação não apresentam alteração de peso ao nascer, entretanto, apresentam maior ganho de peso com doze e dezoito meses de idade do que crianças de mães com resistência à insulina e tratadas com placebo, sugerindo que a metformina pode ter efeitos maléficis em longo prazo sobre o metabolismo da progênie (CARLSEN; MARTINUSSEN; VANKY, 2012; IJÄS et al., 2015).

Em um estudo realizado em camundongos foi demonstrado que a exposição intrauterina à metformina causa, na vida adulta, aumento do peso corpóreo, do depósito de gordura visceral, da glicemia de jejum e intolerância à glicose, efeitos evidenciados somente quando a prole é exposta à dieta rica em gordura (SALOMÄKI et al., 2013), indicando que a metformina pode causar alterações metabólicas na prole exposta, que serão manifestas na vida adulta. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer os reais efeitos da metformina sobre o metabolismo e composição corporal da prole exposta.

Doenças metabólicas como obesidade e diabetes estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento de disfunção vascular e conseqüentemente de doenças cardiovasculares, como, hipertensão arterial e doença vascular periférica. De fato, indivíduos obesos apresentam prejuízo da função endotelial caracterizada por reduzida vasodilatação dependente do endotélio (STAPLETON et al., 2008). A disfunção endotelial na obesidade constitui um dos mecanismos pelos quais esta condição leva ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FRUHBECK, 2004).

O endotélio vascular tem papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular. Além de proporcionar uma barreira física entre o lúmen e a parede do vaso, o endotélio regula ativamente o tônus vascular basal e a reatividade vascular em condições fisiológicas, respondendo a forças mecânicas e a mediadores neuro-humorais, além de liberar uma série de fatores relaxantes (fatores relaxantes derivados do endotélio – EDRFs) e contráteis (fatores contráteis derivados do endotélio – EDCFs) frente a estímulos específicos. 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 (FURGHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Em condições fisiológicas, o tônus vascular é garantido pelo equilíbrio exercido por estes fatores. O desequilíbrio na produção e/ou liberação desses fatores, com aumento de EDCFs e/ou diminuição de EDRFs, caracteriza a disfunção endotelial (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1999).

O efeito protetor da metformina no sistema vascular tem sido descrito. Ratos obesos não-diabéticos tratados com metformina apresentam melhora da função

vascular, por mecanismo que envolve redução de EROs, correção do desequilíbrio na liberação de prostanóides constritores e relaxantes, e ainda por aumento da sensibilidade do músculo liso ao NO (LOBATO et al., 2012a). Além disso, o tratamento com a metformina em camundongos diabéticos melhora a função endotelial, a função das células progenitoras endoteliais, e aumenta a fosforilação do NO sintase endotelial (eNOS) e da AMPK (YU et al., 2016). No entanto, as consequências tardias sobre o sistema vascular na prole exposta maternalmente à metformina não estão caracterizadas.

Estudos têm demonstrado que a metformina reduz a pressão arterial média (PAM) em modelos animais e em humanos hipertensos e diabéticos, através do bloqueio ganglionar e dos receptores α -adrenérgico (MANZELLA et al., 2004; PETERSEN; DIBONA, 1996; PEULER, 1999). Entretanto, em modelos animais e humanos normotensos a pressão arterial não se altera com o tratamento com a metformina (CAMPBELL et al., 1987; WULFFELÉ et al., 2005). Também tem sido demonstrado que o tratamento intracerebroventricular com metformina, em ratos espontaneamente hipertensos reduz a frequência cardíaca (FC), a PAM e a atividade do nervo simpático renal, provavelmente por um efeito simpato-inibitório, no entanto não se sabe se a exposição à metformina durante a gestação poderia interferir na PAM e FC da prole exposta.

Diante da escassez de estudos que avaliem as consequências tardias para a prole exposta à metformina, este trabalho justifica-se pela busca possíveis alterações cardiovasculares e metabólicas decorrentes dessa exposição durante a gestação e lactação a este fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar se a exposição materna à metformina durante a gestação e lactação pode causar alterações nos parâmetros cardiovasculares e metabólicos da prole masculina e feminina adulta.

2.1.2 Objetivos específicos

Para tanto, os objetivos específicos foram avaliar na prole exposta à metformina:

- O fenótipo metabólico em ratos e ratas adultos, através de medidas de sensibilidade à insulina, peso de gorduras e índice de massa corpórea;
- A PAM e FC em ratos e ratas adultos;
- A responsividade da aorta torácica ao agente vasoconstrictor (fenilefrina) e vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) em ratos adultos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

Para este trabalho, foram utilizados ratos e ratas da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Esses animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde 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.

Para o acasalamento, no final da tarde foram colocadas duas fêmeas para um macho na mesma gaiola, durante toda a noite. Na manhã do dia seguinte foi realizado o esfregaço vaginal e a fêmea foi considerada prenhe se no esfregaço fossem observados espermatozoides e a fase estro ao microscópio óptico. Neste dia, denominado dia gestacional 0 (DG 0), as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em gaiolas individuais para compor os quatro grupos experimentais (10-11 mães/grupo):

- Controle Gestacional (CTRG): receberam água por gavagem do dia DG0 ao DG21;

- Metformina Gestacional (METG): tratados diariamente com 293mg/kg de metformina (Glifage®, Laboratório MERCK S.A, Brasil), por gavagem do dia DG0 ao DG21;

- Controle Gestacional e lactacional (CTRGL): receberam água por gavagem do dia DG0 ao DPN21;

- Metformina Gestacional e lactacional (METGL): tratados diariamente com 293mg/kg de metformina (Glifage®, Laboratório MERCK S.A, Brasil), por gavagem do dia DG0 ao DPN21;

Para gestantes a metformina é recomendada na dose de 500mg/dia (EYAL et al., 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009), o que equivale a 7,14 mg/kg/dia para um adulto de 70 kg. Realizando ajuste dosimétrico utilizando a escala $BW^{3/4}$ (EPA, 2006) e considerando o peso de um humano de 70 kg e o de um roedor com 250 g,

obtemos o valor de 29,26mg/kg/dia. Assim, a dose de 293mg/Kg/dia foi escolhida adotando o fator 10 (variação intraespécie) e considerando a proximidade com alguns estudos na literatura (LOBATO et al., 2012a; SALOMÄKI et al., 2013).

As fêmeas foram pesadas a cada três dias para acompanhamento do ganho de peso e para ajuste da dose a ser administrada durante toda a gestação e lactação. A variação do ganho de peso das mães durante a gestação foi descrito como: $\Delta = \text{peso DPN1} - \text{peso DG0}$ e durante a lactação como: $\Delta = \text{peso DPN21} - \text{peso DPN1}$. O consumo de ração das mães foi avaliado semanalmente durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL) e demonstrado como área sob a curva (AUC).

O dia de nascimento foi denominado dia pós-natal 0 (DPN 0) e no DPN 1 os filhotes foram identificados por sexo e pesados. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas a 10 filhotes (6 machos e 4 fêmeas, quando possível) com guilhotina, a fim de que a quantidade de droga recebida pelo filhote através do leite fosse semelhante entre cada prole. Os filhotes foram pesados nos DPN 1, 4, 7, 14 e 21 quando foram desmamados e alocados em grupos (5 animais por gaiola).

As proles masculinas e femininas foram avaliadas na fase adulta (DPN 75-80), sendo que a prole feminina foi utilizada em fase estro, determinado por esfregaço vaginal. Cada ninhada constituiu uma unidade experimental.

Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL: 6996.2015.02).

3.2 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares

3.2.1 Avaliação da reatividade da aorta torácica isolada a agentes vasoconstritores e vasodilatadores:

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), e após toracotomia, o sangue foi removido por punção cardíaca e as porções torácica da aorta foram removidas, separadas, dissecadas e seccionadas em quatro anéis transversais (5

mm de comprimento), segundo técnica descrita (CARVALHO et al., 1987). Dois dos anéis de aorta tiveram o endotélio removido (E-) por fricção com uma haste fina de algodão e nos outros dois anéis o endotélio foi preservado (E+). Os anéis foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável, um fixo a base da cuba para órgãos isolados e o outro conectado a um transdutor isométrico (FT03, Grass) acoplado a um amplificador de sinal (AECAD 04, AVS Projetos) e este a um computador. Os segmentos de aorta permaneceram sob tensão de 1,5g em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada (concentrações em mM: 130 NaCl, 14,9 NaHCO₃; 4,7 KCl; 1,18 KH₂PO₄; 1,17 MgSO₄·7H₂O; 5,5 glicose; 1,56 CaCl₂·2H₂O e 0,026 EDTA), gaseificada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, mantidos aquecidos a 37°C durante todo o protocolo experimental, como previamente descrito pelo nosso grupo (CERAVOLO et al., 2013; HIGASHI et al., 2016).

Após 30 min de estabilização, a integridade do endotélio foi testada pela adição de acetilcolina (ACh-3 µM) nos anéis aórticos pré-contraídos com fenilefrina (Fenil-3 µM). O endotélio foi considerado intacto se o relaxamento induzido pela ACh for maior do que 80% e removido quando o relaxamento for menor que 5% da pré-contração.

Para a avaliação da capacidade contrátil, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas (CCE) para o agonista α₁-adrenérgico, Fenil (1 nM-30 µM), e as respostas foram expressas em gramas (g) de tensão. Para avaliar a função relaxante, CCE foram construídas para ACh (1 nM-30 µM) e para nitroprussiato de sódio (NPS: 0.1nM- 3µM) em anéis aórticos, ambos após pré-contração de Fenil (3 µM) e o relaxamento expresso como porcentagem da pré-contração.

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} (pD₂) foram calculadas utilizando uma análise de regressão não-linear (GraphPad Prism software, USA).

3.2.2 Avaliação da frequência cardíaca e pressão arterial média

A PAM e a FC foram mensuradas em ratos (machos e fêmeas) conscientes por um método indireto, através de pletismografia de cauda (CODA, Kent Scientific,

Torrington, CT). Um oclusor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda do rato, acoplado ao esfigmomanômetro conectado a um sistema de transdução. Os ratos foram familiarizados com o aparato antes do início das medições. Foram realizadas vinte medidas em cada rato e as médias foram utilizadas como unidade experimental.

3.3 Avaliação dos parâmetros metabólicos

3.3.1 Teste de tolerância à insulina

Os ratos (machos e fêmeas) foram privados de alimento por quatro horas, mas mantidos com acesso livre à água. Após a restrição alimentar, os ratos foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (40mg/Kg, ip). Amostras de sangue da cauda foram coletadas antes (tempo 0) e 10, 20, 30, 40 min depois de uma injeção intraperitoneal de insulina regular (1,5 U/kg, Humulin[®] - Insulina Humana R, Eli Lilly, EUA) (CARVALHO-FILHO et al., 2005). A glicemia foi avaliada utilizando um glicosímetro (Accu-Check Active, Roche Diagnóstico, Brasil). A constante de decaimento da glicemia durante o teste de tolerância à insulina (kITT) foi calculada baseada na regressão linear do logaritmo neperiano das concentrações de glicose obtidas durante o teste.

3.3.2 Avaliação da obesidade

Os ratos (machos e fêmeas) foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), pesados e medidos o comprimento naso-anal (cm) com o auxílio de uma régua para o cálculo do Índice de Lee: [raiz cúbica do peso(g)/comprimento naso-anal(cm)x100]. Os tecidos adiposos viscerais (perigonadal e retroperitoneal) foram excisados e pesados e os valores expressos como peso da gordura por 100g de peso corpóreo.

3.4 Análise estatística:

Inicialmente, uma análise exploratória foi realizada para avaliar a distribuição normal (Shapiro–Wilk test) e homogeneidade de variância (Levene's test) de cada variável. As variáveis que apresentaram distribuição e homogeneidade normal foram analisadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Bonferroni (reatividade aórtica); ANOVA de medidas repetidas (consumo de ração) ou Teste T Student (demais variáveis). Para as variáveis, não-paramétricas, Test Mann Whitney foram aplicadas. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M para os testes paramétricos ou mediana (1º e 3º quartil) para os testes não-paramétricos. Na ordem de avaliar a possível alteração dependente do período de exposição à metformina, o grupo CTRG foi comparado com o METG, enquanto que o grupo CTRGL foi comparado somente com o METGL. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 6 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA) e o SPSS (IBM, SPSS statistics 19).

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros maternos e dos neonatos

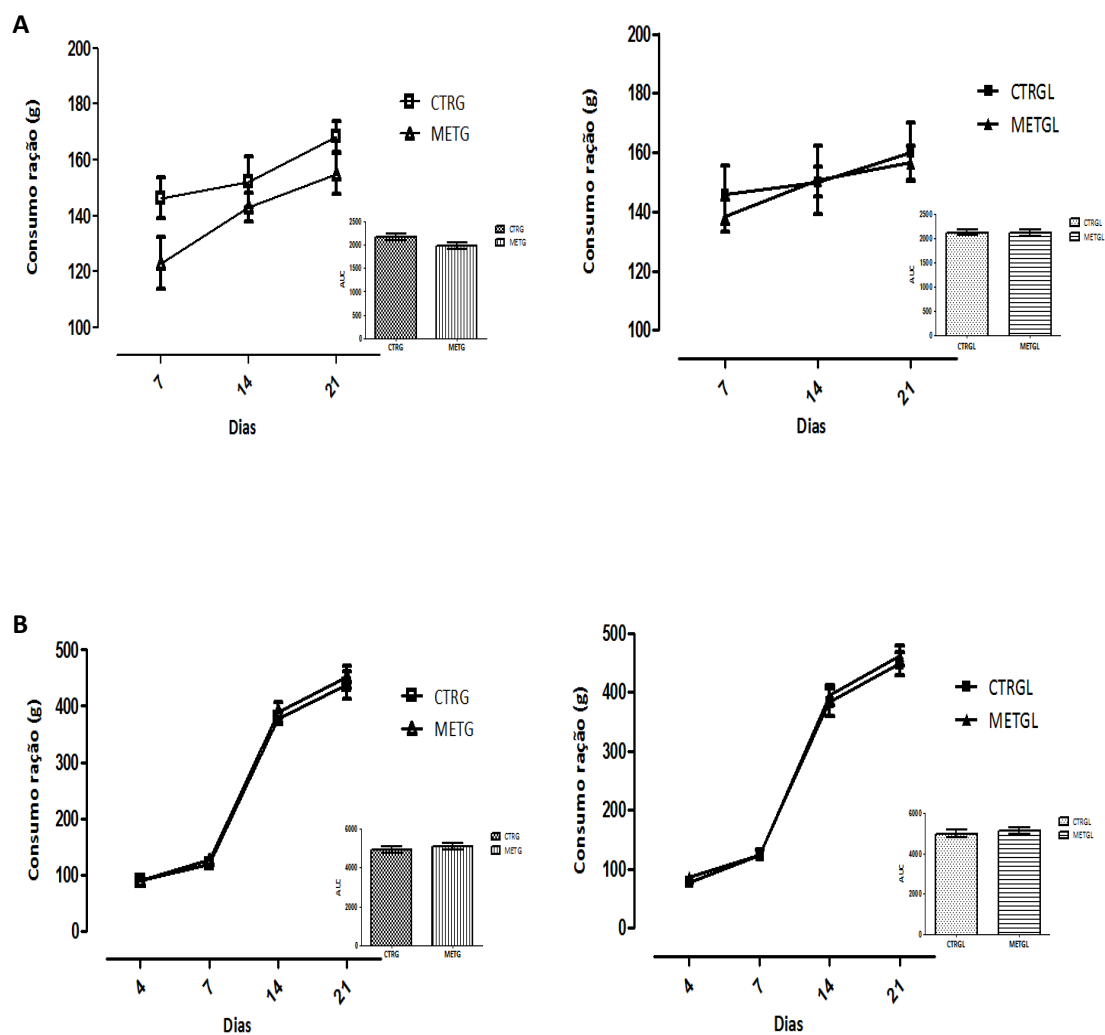
Como é possível observar na tabela 1, a variação (Δ) do ganho de peso materno durante a gestação, DG0 ao DPN1, foi menor nos grupos metformina (METG, METGL) comparados aos grupos controles (CTRG, CTRGL), no entanto a variação do ganho de peso do DPN1 ao DPN21 foi similar entre os grupos metformina (METG, METGL) e seus respectivos controles (CTRG, CTRGL). O peso ao nascer das proles expostos à metformina (METG, METGL) não diferiu dos seus respectivos grupos controles (CTRG, CTRGL). O número de filhotes por ninhada foi significadamente menor nos grupos metformina quando comparados aos grupos controles (Tabela 1). Não houve diferença no consumo de ração entre as mães metformina e seus respectivos controles durante os períodos gestacional e lactacional (Figura 1A e 1B).

Tabela 1. Parâmetros biológicos avaliados nas mães e nas proles expostas à metformina (MET) ou água (CTR).

Grupos	Varição do ganho de peso ($\Delta = \text{DPN1-DG0}$)	Varição do ganho de peso ($\Delta = \text{DPN21-DPN1}$)	Peso ao nascer dos filhotes (g)/ ninhada	Número de filhotes/ninhada
CTRG	33,21 \pm 2,85 (10)	12,38 \pm 4,27 (10)	6,11 \pm 0,14 (10)	12,50 \pm 0,34 (10)
METG	23,93 \pm 2,99*(11)	19,38 \pm 3,46 (11)	6,38 \pm 0,16 (11)	10,91 \pm 0,46*(11)
CTRGL	34,04 \pm 3,50 (10)	15,53 \pm 5,65 (10)	6,15 \pm 0,17 (10)	12,70 \pm 0,62 (10)
METGL	23,86 \pm 3,20* (10)	27,65 \pm 3,54 (10)	6,44 \pm 0,20 (10)	10,90 \pm 0,57*(10)

Dados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n) é o numero de ratos/grupo. * $p < 0,05$ (Teste T Student). DG0: dia gestacional 0; DPN1: dia pós natal 1; DPN21: dia pós natal 21. CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

Figura 1. Consumo de ração (g) das mães expostas à metformina ou água.



Consumo de ração (g) das mães expostas à metformina (METG; METGL) ou água (CTR; CTRGL) durante os períodos gestacional (A) e lactacional (B). Dados foram expressos como a média \pm E.P.M, $n = 10-11$, $p > 0.05$ (ANOVA medidas repetidas). CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

4.2 Reatividade da aorta, PAM e FC

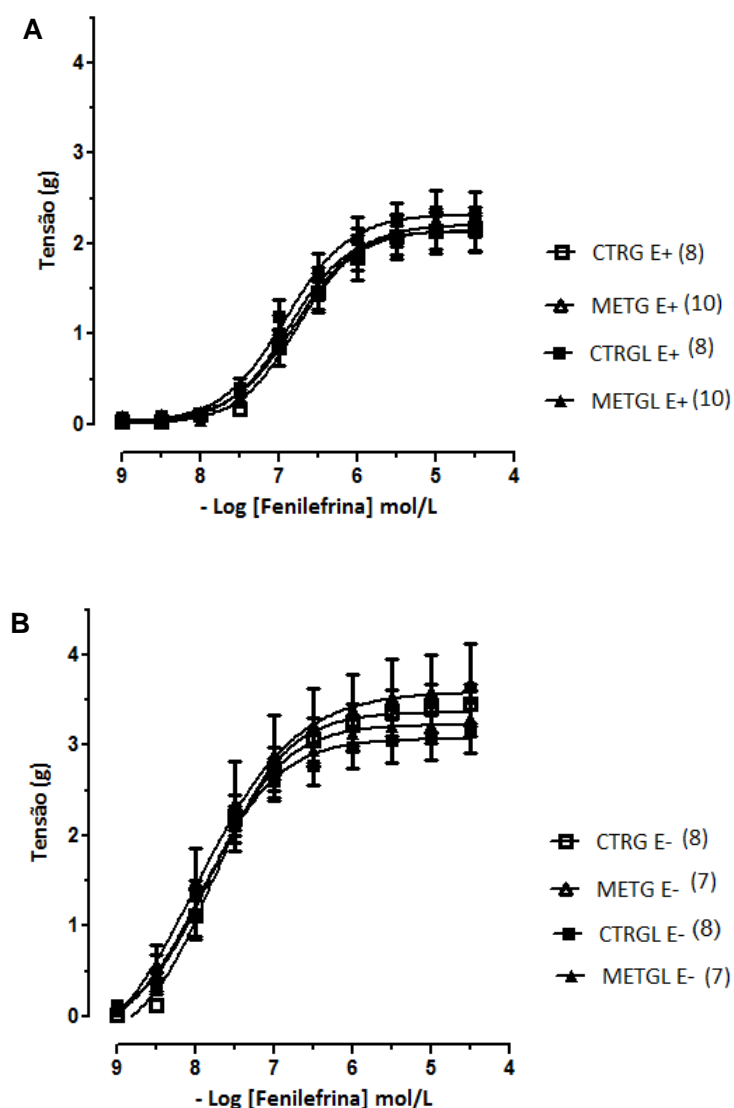
Os fármacos Fenil, ACh e NPS induziram resposta dependente da concentração nos anéis de aorta isolados da prole masculina adulta dos grupos metformina e controle (Figura 2 e 3). A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil à Fenil em anéis de aorta isolados dos ratos metformina e controle quando comparados aos seus respectivos anéis E + (Tabela 2). A Rmax e pD2 para Fenil foram similares entre os anéis E + (Figura 2A) isolados dos grupos METG ou METGL e seus respectivos controles (CTRG e CTRGL). Além disso, a Rmax e o pD2 para Fenil em anéis E - (Figura 2B) não foram diferentes entre os grupos metformina e seus respectivos controles (Tabela 2). A Rmax e pD2 para ACh e NPS também foram similares entre os grupos (Tabela 3, Figura 3).

Tabela 2. Resposta máxima e pD2 (logaritmo negativo da concentração do agonista em 50% da resposta máxima) em anéis de aorta com e sem endotélio para fenilefrina

Grupos	Rmax (Fenil)		pD2 (Fenil)	
	E +	E -	E +	E -
CTRG	2,27 ± 0,23	3,34 ± 0,27*	6,78 ± 0,07	7,85 ± 0,10*
	(8)	(8)	(8)	(8)
METG	2,21 ± 0,11	3,29 ± 0,46**	6,80 ± 0,06	7,89 ± 0,34**
	(10)	(7)	(10)	(7)
CTRGL	2,38 ± 0,24	2,82 ± 0,29*	6,93 ± 0,06	7,98 ± 0,14*
	(10)	(8)	(10)	(8)
METGL	1,95 ± 0,22	3,06 ± 0,21**	6,81 ± 0,07	7,83 ± 0,27**
	(8)	(7)	(8)	(7)

Contração induzida pela fenil em anéis de aorta isolados de machos adultos expostos à metformina ou água durante os períodos gestacional e lactacional. Rmax é a resposta máxima pD2 é o logaritmo negativo da concentração do agonista em 50% da Rmax. Dados foram expressos como a média ± E.P.M. (n) é o numero de ratos/grupo. * $p < 0,05$ vs E + CTRG (controle gestacional) ou CTRGL (controle gestacional e lactacional) (ANOVA de uma via, pós-teste: Bonferroni); ** $p < 0,05$ vs E + METGL (metformina gestacional e lactacional) ou METG (metformina gestacional).

Figura 2. Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio.



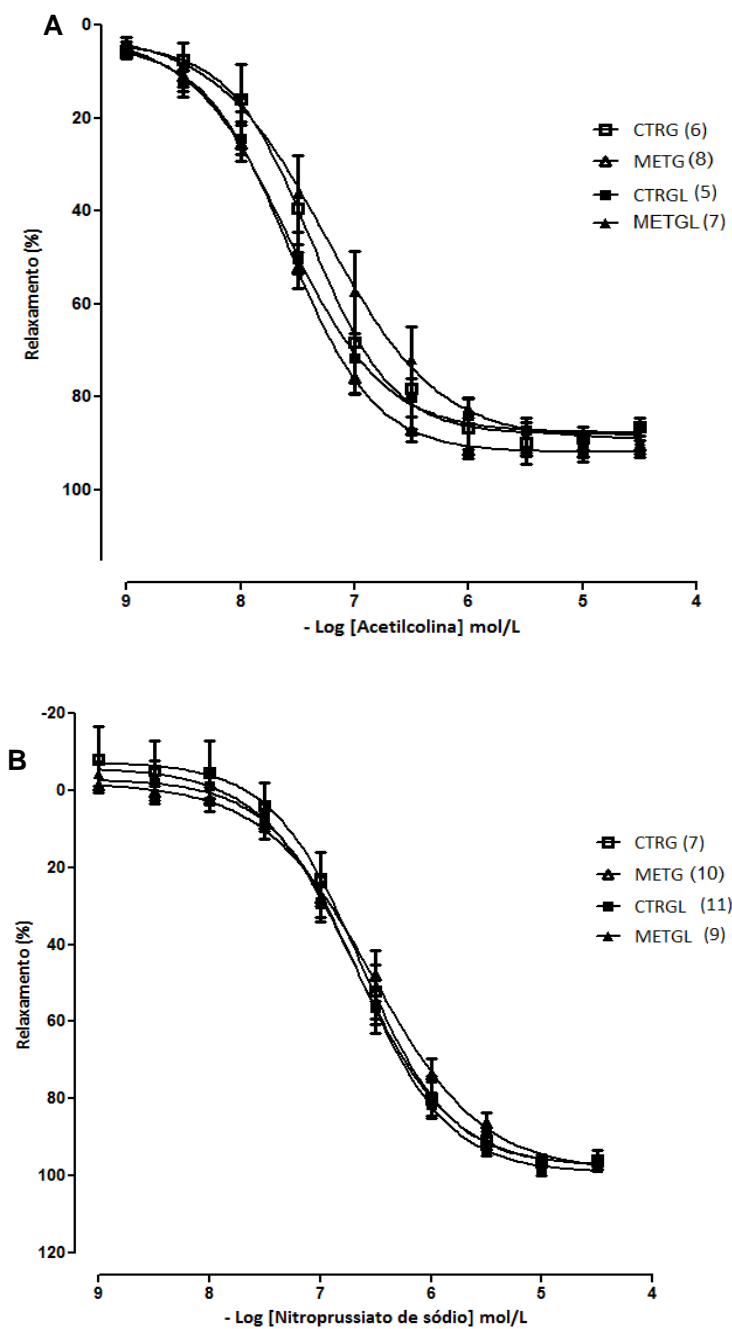
Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil) E + (A) e E - (B) de machos adultos expostos à metformina ou água durante os períodos gestacional e lactacional. Dados foram expressos como a média \pm E.P.M., $n = 7-10$, $p > 0.05$ (ANOVA de uma via, pós-teste: Bonferroni). CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

Tabela 3. Resposta máxima e pD2 (logaritmo negativo da concentração do fármaco em 50% da resposta máxima) em anéis de aorta com e sem endotélio para acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS).

Grupos	Rmax		pD2	
	ACh (%)	NPS (%)	ACh (%)	NPS (%)
CTRG	91,30 ± 2,19	95,48 ± 0,81	7,44 (6,90-7,60)	6,75 ± 0,11
	(6)	(7)	(6)	(7)
METG	90,34 ± 2,18	94,31 ± 0,94	7,54 (7,45-7,79)	6,41 ± 0,11
	(8)	(10)	(8)	(10)
CTRGL	89,67 ± 2,24	96,28 ± 1,15	7,70 (7,52-7,76)	6,57 ± 0,07
	(5)	(11)	(5)	(11)
METGL	91,77 ± 2,23	95,43 ± 1,05	7,36 (6,82-7,56)	6,82 ± 0,11
	(7)	(9)	(7)	(9)

Relaxamento induzido pela ACh ou NPS em anéis aórticos da prole masculina adulta exposta à metformina ou água durante os períodos gestacional e lactacional. Rmax é a resposta máxima e pD2 é o logaritmo negativo da concentração do fármaco em 50% da Rmax. A Rmax foi expressa como a média ± E.P.M e analisada por ANOVA de uma via, pós-teste: Bonferroni. pD2 foi expresso como a mediana (1º e 3º quartil) e analisada pelo teste não-paramétrico Mann Whitney. (n) é o numero de ratos/grupo. CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

Figura 3. Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina, na presença de endotélio, e nitroprussiato de sódio obtidos em anéis aórticos sem endotélio.



Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (A), na presença de endotélio, e nitroprussiato de sódio (B) obtidos em anéis aórticos sem endotélio. Dados foram expressos como a média \pm E.P.M., $n = 5-10$, $p > 0.05$ (ANOVA de uma via, pós-teste: Bonferroni). CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

A PAM da prole masculina e feminina adulta exposta à metformina (METG e METGL) foi similar quando comparada com seus respectivos controles de mesmo sexo (CTRG and CTRGL). A FC da prole feminina adulta METGL apresentou aumento quando comparada a do grupo CTRGL, e a FC das fêmeas METG foi semelhante a do grupo CTRG. A FC nos machos adultos METG e METGL foi similar a dos seus respectivos controles (CTRG and CTRGL) (Tabela 4).

Tabela 4. Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) avaliados em machos e fêmeas adultos expostos à metformina (MET) ou água (CTR).

Grupos	Machos		Fêmeas	
	PAM	FC	PAM	FC
CTRG	111,1 ± 2,51 (10)	357,5 ± 8,67 (10)	99,0 ± 2,63 (7)	363,7 ± 8,62 (10)
METG	108,0 ± 3,95 (11)	355,6 ± 4,91 (11)	101,7 ± 3,80 (11)	366,5 ± 6,82 (11)
CTRGL	108,1 ± 3,95 (10)	351,7 ± 7,30 (10)	98,7 ± 3,36 (10)	372,8 ± 8,27 (10)
METGL	105,0 ± 2,90 (10)	345,0 ± 6,70 (10)	104,1 ± 3,61 (10)	392,6 ± 4,26* (10)

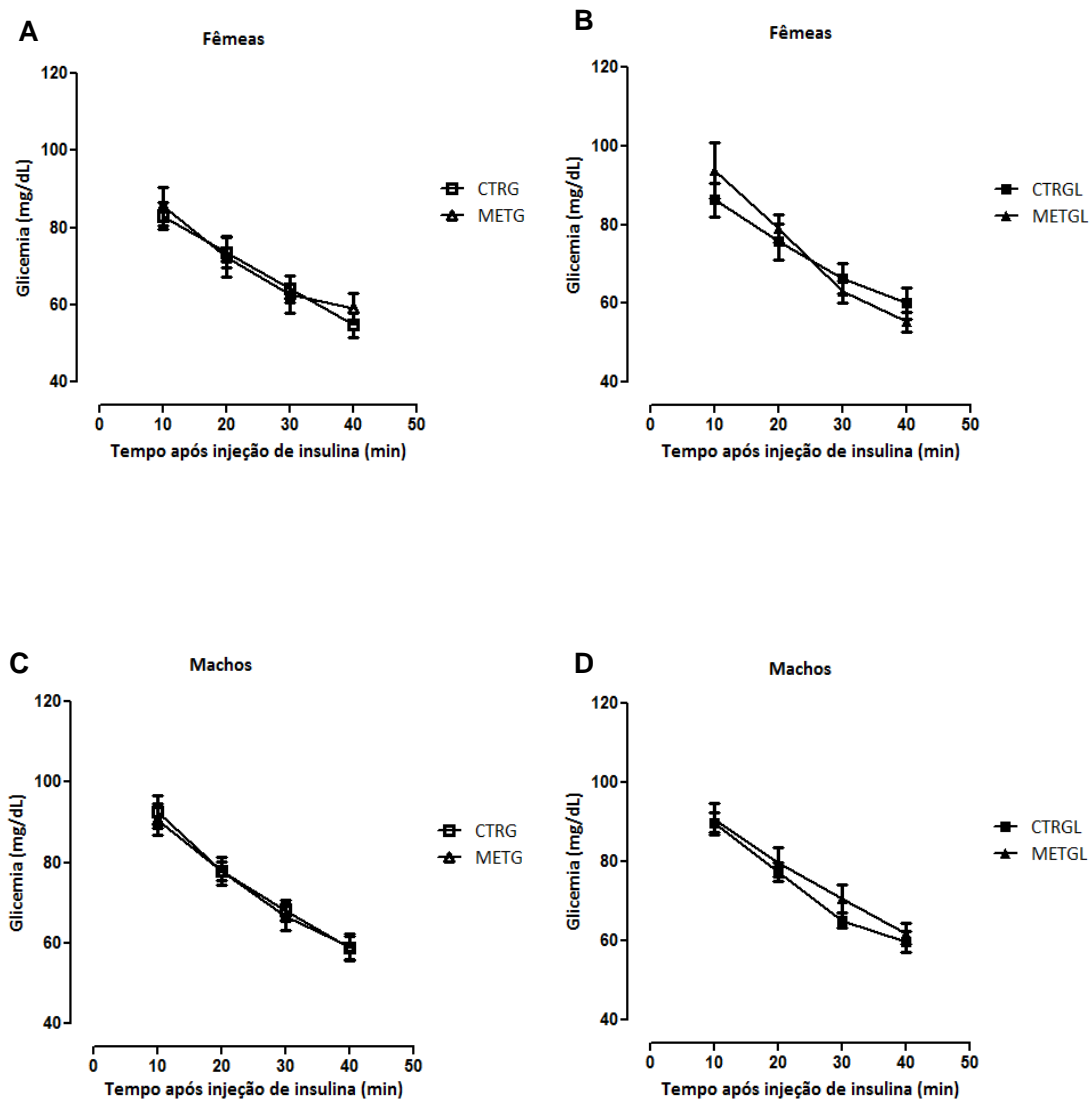
Dados foram expressos como a média ± E.P.M. (n) é o número de ratos/grupo. *p<0,05 (Teste T Student). CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

4.3 Parâmetros metabólicos

Não houve diferença no kITT (Figura 4) e nos níveis glicêmicos basais (Tabela 5) de machos e fêmeas adultos METG e METGL comparados aos seus respectivos controles de mesmo sexo (CTRG e CTRGL).

Nenhuma diferença foi notada no peso corpóreo e no índice de Lee de machos e fêmeas adultos expostos à metformina (METG, METGL) em relação aos grupos controle. Quanto à composição corporal, a gordura perigonadal apresentou-se reduzida nas fêmeas adultas METG quando comparadas às CTRG, mas semelhante entre fêmeas METGL e CTRGL. Nos machos METG e METGL a gordura perigonadal foi semelhante aos controles. A gordura retroperitoneal apresentou-se reduzida nos machos adultos METGL comparados ao CTRGL, mas foi similar em machos METG, e fêmeas (METG e METGL) em relação aos seus controles do mesmo sexo (Tabela 5).

Figura 4. Teste de tolerância à insulina na prole masculina e feminina adulta.



Teste de tolerância à insulina para a prole masculina (A, B) e feminina (C, D). Dados foram expressos como a média \pm E.P.M., $n = 7-10$, $p > 0.05$ (Teste T Student). CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

Tabela 5. Avaliação da obesidade na prole masculina e feminina adulta e glicemia basal.

Macho Adulto					
Grupos	Peso (g)	Índice de Lee	Gordura perigonadal (g/100g)	Gordura retroperitoneal (g/100g)	Glicemia basal (mg/dl)
CTRG	365,4 ± 7,07 (9)	29,82 ± 0,22 (9)	1,02 ± 0,13 (9)	1,38 ± 0,12 (9)	102,4 ± 4,76 (9)
METG	343,9 ± 5,40 (10)	29,75 ± 0,22 (10)	0,87 ± 0,06 (10)	1,14 ± 0,14 (10)	100,2 ± 6,05 (10)
CTRGL	365,6 ± 3,88 (10)	30,06 ± 0,29 (10)	1,11 ± 0,10 (10)	1,52 ± 0,14 (10)	101,9 ± 4,30 (9)
METGL	355,6 ± 2,84 (9)	29,32 ± 0,45 (9)	0,92 ± 0,09 (9)	1,02 ± 0,10 * (9)	98,8 ± 4,01 (9)
Fêmea Adulta					
Grupos	Peso (g)	Índice de Lee	Gordura perigonadal (g/100g)	Gordura retroperitoneal (g/100g)	Glicemia basal (mg/dl)
CTRG	225,3 ± 8,93 (10)	30,09 ± 0,39 (10)	0,62 ± 0,09 (10)	0,97 ± 0,15 (10)	93,1 ± 3,62 (7)
METG	221,3 ± 8,05 (11)	30,42 ± 0,22 (11)	0,42 ± 0,02* (11)	0,69 ± 0,06 (11)	93,0 ± 3,57 (8)
CTRGL	222,9 ± 6,72 (10)	29,54 ± 0,27 (10)	0,47 ± 0,06 (10)	0,81 ± 0,12 (10)	94,9 ± 4,83 (8)
METGL	228,2 ± 7,88 (10)	29,81 ± 0,44 (10)	0,48 ± 0,08 (10)	0,78 ± 0,06 (10)	101,0 ± 7,16 (7)

Dados foram expressos como a média ± E.P.M. (n) é o número de ratos/grupo. * $p < 0,05$ (Teste T Student). CTRG: controle gestacional; METG: metformina gestacional; CTRGL: controle gestacional e lactacional; METGL: metformina gestacional e lactacional.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que a exposição intrauterina e lactacional à metformina não interferiu com a reatividade de anéis de aorta isolados da prole masculina adulta. Além disso, esta exposição também não causou alterações maléficas nos parâmetros metabólicos na prole feminina e masculina adulta.

Nós consideramos que o tratamento com a metformina não foi tóxico para as mães e para a prole exposta, pois mesmo as mães tendo ganho menos peso durante a gestação e o número de filhotes tenha sido menor por ninhada, o consumo materno de ração e o peso dos filhotes ao nascer não foram afetados. O efeito da exposição materna à metformina no peso corporal da progênie é ainda controverso. Similarmente aos nossos resultados, foi descrito em humanos que o tratamento materno com metformina durante a gestação reduz o ganho de peso materno, sem interferir com o peso dos recém-nascidos. No entanto, com um ano de idade essas crianças são 5% mais pesadas do que aquelas expostas ao placebo (CARLSEN; MARTINUSSEN; VANKY, 2012). Por outro lado, tem sido descrito em camundongos que o tratamento com metformina (300mg/kg/dia) durante a gestação não interfere com o peso corpóreo e com o consumo de ração materno, mas os fetos expostos à metformina apresentam peso reduzido durante o desenvolvimento embrionário e maior peso na fase adulta (SALOMÄKI et al., 2013). As diferenças observadas em nosso estudo poderiam estar relacionadas com as espécies avaliadas (camundongo ou rato); tempo de tratamento (gestacional ou gestacional e lactacional); e a idade da prole avaliada (dia embrionário 18 nos camundongos e 75 dias no nosso estudo). Sendo assim, frente aos diferentes achados na literatura, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos do tratamento gestacional e lactacional com metformina sobre a composição corpórea materna.

Estudos têm demonstrado que o tratamento com metformina melhora a função vascular em ratos obesos não-diabéticos e em camundongos diabéticos através de mecanismo envolvendo o aumento da biodisponibilidade de NO e redução da geração de EROs, ambas atividades mediadas pela via de sinalização da AMPK (LOBATO et al., 2012b; YU et al., 2016). Também tem sido descrito que o diabetes

materno leva a programação de disfunção endotelial na prole adulta (LEIVA et al., 2011; ROCHA et al., 2005), o que parece se instalar por mecanismos similares aos descritos para as artérias de ratos diabéticos adultos e pacientes com diabetes. Considerando que aqui foi demonstrado que a exposição materna à metformina foi segura para a reatividade da aorta da prole exposta, é possível levantar a hipótese de que este tratamento materno poderia promover benefícios vasculares à prole de mães obesas e diabéticas. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

No presente estudo, o tratamento materno com metformina não alterou a PAM da prole feminina e masculina adulta dos diferentes regimes de exposição. Este resultado pode ser explicado, pois as mães e os filhotes não tinham nenhuma condição metabólica alterada, tal como diabetes tipo II, hipertensão arterial, resistência à insulina ou obesidade, condições essas que poderiam levar a um hiperinsulinemia e aumento da PAM (BRESSLER et al., 1996; DESPRÉS et al., 1996). Já é bem descrito que o tratamento com metformina não altera a pressão arterial de animais de experimentação e humanos normotensos (CAMPBELL et al., 1987; WULFFELÉ et al., 2005). Por outro lado, em modelos animais e também em humanos hipertensos e diabéticos este sensibilizador de insulina diminui a PAM, por mecanismo que envolve provável efeito simpato-inibitório da metformina, através do bloqueio ganglionar e dos receptores α -adrenérgico (MANZELLA et al., 2004; PETERSEN; DIBONA, 1996; PEULER, 1999).

Nossos resultados demonstram que a exposição à metformina causou discreto aumento da FC fêmeas no período GL, sem alterar este parâmetro na prole masculina. Segundo estudo realizado em ratos espontaneamente hipertensos, a administração intracerebroventricular de metformina tem efeito simpatoinibitório, sobrepondo o efeito simpatoexcitatório do barorreflexo, reduzindo assim a FC, a PAM e atividade do nervo simpático renal, no entanto os autores sugeriram que o tratamento crônico com a metformina poderia ativar a função barorreflexa e assim, aumentar a FC decorrente da hipotensão (PETERSEN; DIBONA, 1996), o que poderia explicar o discreto aumento da FC mostrado em nosso estudo. Entretanto, é preciso destacar que o estudo descrito avaliou ratos hipertensos tratados com metformina e nosso trabalho avaliou a FC da

prole exposta a este fármaco, de forma que mais estudos são necessários para confirmar os mecanismos envolvidos no aumento da FC de ratas expostas maternalmente à metformina.

No presente estudo foi demonstrado que a exposição à metformina durante a vida uterina e lactação não alterou os níveis glicêmicos basais e o KITT da prole masculina e feminina adulta. Em estudo realizado em ratos obesos não diabéticos, o tratamento com metformina corrige a hiperinsulinemia e o KITT (LOBATO et al., 2012a), por outro lado, machos expostos à metformina durante o desenvolvimento uterino e alimentados com uma dieta rica em gordura, apresentam aumento da glicemia de jejum e intolerância à glicose, que pode ser explicado pela redução da expressão do GLUT4 no tecido adiposo epididimal (SALOMÄKI et al., 2013). As diferenças observadas entre o nosso estudo e os descritos podem estar relacionadas com a inexistência de uma patologia prévia nas mães, que costuma levar a resistência insulínica na prole, ou ao fato da prole ter recebido dieta padrão para roedores e não dieta rica em gordura.

Nossos resultados demonstraram que a exposição à metformina durante a gestação e lactação causou redução do tecido adiposo visceral, sem alteração de peso corporal e do índice de Lee. Nós consideramos esse resultado benéfico, uma vez que, é descrito que o aumento de peso e das gorduras viscerais favorece a instalação do quadro de resistência insulínica e o desenvolvimento de síndrome metabólica (RIBEIRO FILHO et al., 2006). Estudo realizado em ratos obesos não-diabéticos tratados com metformina demonstrou redução no índice de Lee, assim como no acúmulo de tecido adiposo visceral (LOBATO et al., 2012a). Além disso, em humanos ou em modelos animais com diabetes tipo 2 o tratamento com metformina melhora parâmetros metabólicos, como redução do peso corporal (HUNDAL et al., 2010; KNOWLER et al., 2006). Por outro lado, foi demonstrado que camundongos, machos e fêmeas, expostos à metformina (300mg/kg) durante o desenvolvimento intrauterino, que tiveram baixo peso ao nascer e receberam uma dieta rica em gordura do DPN 9 ao DPN 20, apresentaram aumento no peso corporal e de gorduras mesentéricas na vida adulta (SALOMÄKI et al., 2013). Provavelmente esse aumento do peso corporal e das gorduras viscerais está relacionado a uma programação fetal, causada ao baixo peso

ao nascer (BARKER, 1990) e ao recebimento da dieta rica em gordura, diferenciando assim estes achados dos nossos.

Em resumo, nós demonstramos que a exposição à metformina durante a gestação e lactação não interfere com a reatividade aórtica, aumenta a FC e teve efeitos benéficos sobre o metabolismo da prole adulta masculina e feminina. Além disso, a exposição à metformina não induz toxicidade materna e neonatal.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento materno com metformina durante a gestação e lactação foi seguro para as mães e para os filhotes expostos, e que esta exposição provavelmente não programa disfunção endotelial e é aparentemente benéfica do ponto de vista metabólico para a prole adulta.

REFERÊNCIAS

- ALI, A. T. et al. Insulin resistance in the control of body fat distribution: A new hypothesis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, n. 2, p. 77–80, 2011.
- BALANI, J.; HYER, S. L.; RODIN, D. A. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes with metformin or insulin: a case-control study. **Diabet Med**, v. 26, p. 798–802, 2009.
- BARKER, D. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ: British Medical Journal**, v. 301, n. 156, p. 1111, 1990.
- BOLTON, S. et al. Continuation of metformin in the first trimester of women with polycystic ovarian syndrome is not associated with increased perinatal morbidity. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, n. 2, p. 203–206, 2009.
- BONEY, C. M. et al. Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. **Pediatrics**, v. 115, n. 3, p. e290–e296, 2005.
- BRESSLER, P. et al. Insulin resistance and coronary artery disease. **Diabetologia**, v. 39, n. 11, p. 1345–1350, 1996.
- CAMPBELL, I. W. et al. The effect of metformin on glycaemic control, intermediary metabolism and blood pressure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 4, n. 4, p. 337–341, 1987.
- 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, 2012.
- CARVALHO-FILHO, M. A. et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: A novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, v. 54, n. April, p. 959–967, 2005.
- CARVALHO, M. H. et al. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **Journal of hypertension**, v. 5, n. 3, p. 377–82, 1987.
- CATALANO, P. M. et al. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 1076–1080, 2009.
- CERAVOLO, G. S. et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341–346, 2013.
- CHO, N. H. et al. Global Guideline: pregnancy and diabetes. **International diabetes federation**, 2009.
- DESPRÉS, J.-P. et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. **N Engl J Med**, v. 334, n. 15, p. 952–957, 1996.
- 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. et al. Pharmacokinetics of metformin during pregnancy. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 5, p. 833–840, 2010.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **J Physiol Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 525–534, 1999.
- FRUHBECK, G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 2, n. 3, p. 197–208, 2004.
- FURGHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors FASEB J. v.3, n.9, p. 2007-2018, 1989. **FASEB J.**, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, 1989.

- GILBERT, C.; VALOIS, M.; KOREN, G. Pregnancy outcome after first-trimester exposure to metformin: a meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 658–663, 2006.
- GLATSTEIN, M. M. et al. Use of hypoglycemic drugs during lactation. **Canadian Family Physician**, v. 55, n. 4, p. 371–373, 2009.
- GLUCKMAN, P. D. et al. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nat.Rev.Endocrinol.**, v. 5, n. 7, p. 401–408, 2009.
- GLUECK, C. J. et al. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. **Hum Reprod**, v. 17, n. 11, p. 2858–2864, 2002.
- GLUECK, C. J. et al. POLYCYSTIC OVARY SYNDROME Prevention of gestational diabetes by metformin plus diet in patients with polycystic ovary syndrome. v. 89, n. 3, 2008.
- GUTZIN, S. J.; KOZER, E.; MAGEE, L. A. The safety of oral hypoglycemic agents in the first trimester of pregnancy: a meta-analysis. **Can J Clin Pharmacol**, v. 10, p. 179–183, 2003.
- HAWLEY, S. A. et al. The Antidiabetic Drug Metformin Activates the AMPK. **Diabetes**, v. 51, n. August, p. 2420–25, 2002.
- HIGASHI, C. M. et al. 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.
- HOLMES, B. F.; WINDER, W. W. Chronic activation of 5?-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle B. **Journal of applied physiology**, v. 87, n. 5, p. 1990–1995, 1999.
- HUNDAL, R. S. et al. Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes Ripudaman. **Diabetes**, v. 49, p. 2063–2069, 2010.
- HUNG, C. et al. Metformin regulates oxLDL-facilitated endothelial dysfunction by modulation of SIRT1 through repressing LOX-1-modulated oxidative signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, p. 10773–10787, 2016.
- IJÄS, H. et al. 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 and gynaecology**, v. 122, n. 7, p. 994–1000, 2015.
- 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. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 51, n. 2, p. 125–129, 2011.
- KLÖTING, N. et al. Insulin-sensitive obesity. **American Journal of ...**, v. 299, n. 3, p. 506–515, 2010.
- KNOWLER, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, v. 346, n. 6, p. 393–403, 2006.
- KOVO, M. et al. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 136, n. 1, p. 29–33, 2008.
- KUGEL, S.; MOSTOSLAVSKY, R. SIRT1 activators: The evidence STACKs up. **Aging**, v. 5, n. 3, p. 142–143, 2013.
- LANGER, O. et al. A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. **N Engl J Med**.v.343, n.16, p.1134-1138, 2000. **N Engl J Med**, v. 343, n. 16, p. 1134–1138, 2000.
- LEIVA, A. et al. Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of human adult diseases in subjects born from gestational

diabetes mellitus or obesity in pregnancy. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, n. Cvd, 2011.

LOBATO, N. S. et al. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. **Life Sciences**, v. 90, n. 5–6, p. 228–235, 2012a.

LOBATO, N. S. et al. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 392–400, 2012b.

LONG, Y. C.; ZIERATH, J. R. Review series AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1776–1783, 2006.

MANZELLA, D. et al. Blood pressure and cardiac autonomic nervous system in obese type 2 diabetic patients: Effect of metformin administration. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 3, p. 223–227, 2004.

MATTAGAJASINGH, I. et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 37, p. 14855–60, 2007.

MORIN-PAPUNEN, L. et al. 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. May, p. 1492–1500, 2012.

PETERSEN, J. S.; DIBONA, G. F. Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 619–625, 1996.

PEULER, J. D. Opposing adrenergic actions of intravenous metformin on arterial pressure in female spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 1, p. 237–247, 1999.

RIBEIRO FILHO, F. F. et al. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 230–238, 2006.

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

ROWAN, J. A. . et al. Metformin versus Insulin for the Treatment of Gestational Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 19, p. 2003–15, 2008.

SALOMÄKI, H. et al. 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. 1–12, 2013.

SCARPELLO, J. H. B.; HOWLETT, H. C. S. Metformin therapy and clinical uses. **Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease**, v. 5, n. 3, p. 157–167, 2008.

SINCLAIR, KD; LEA, RG; REES, WD; YOUNG, L. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 425–443, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Rio de Janeiro**, p. 400, 2009.

STAPLETON, P. A. et al. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP**, v. 15, n. 2, p. 79–89, 2008.

- STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. AMPK in Health and Disease. **Physiological reviews**, v. 89, n. 3, p. 1025–1078, 2009.
- VIOLLET, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 122, n. 6, p. 253–70, 2012.
- WULFFELÉ, M. G. et al. Does metformin decrease blood pressure in patients with Type 2 diabetes intensively treated with insulin? **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 7, p. 907–913, 2005.
- YU, J.-W. et al. Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, p. 88, 2016.
- ZHOU, G. et al. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 2001.

ANEXO

Anexo 1 – 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 nº6996.2015.02, 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 prenhe será determinada quando observados espermatozoides e a fase estro a partir da realização do esfregaço vaginal. A partir da determinação da prenhe, 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 taracotomia 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 Aparecido Verrri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Graziela Sciantti 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.