



**PAPEL DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E INFLUÊNCIA
DO GÊNERO NA CAPACIDADE DE
DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES INICIAIS EM
DIFERENTES MODELOS DE DIABETE
EXPERIMENTAL**

ALINE BUENO

Botucatu
2016

ALINE BUENO

**PAPEL DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E INFLUÊNCIA
DO GÊNERO NA CAPACIDADE DE
DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES INICIAIS EM
DIFERENTES MODELOS DE DIABETE
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia. Área de concentração: Tocoginecologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Prof Dr Felipe Perecin

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA
INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU -
UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bueno, Aline.

Papel do sistema antioxidante e influência do gênero na
capacidade de desenvolvimento de embriões iniciais em
diferentes modelos de diabete experimental / Aline Bueno.
- Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Débora Cristina Damasceno Coorientador:
Felipe Perecin Capes: 40101150 1.

Diabetes mellitus. 2. Complicações do diabetes. 3.
Embrião. 4. Prenhez. 5. Antioxidantes. 6. Oxirredução. 7.
Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Diabetes; Embrião; Estado redox; Prenhez.

*“Se os bons combates eu não combater, minha coroa não conquistarei.
Se minha carreira eu não completar, de que vale a minha fé tanto guardar?”*
Pe. Fábio de Melo

Dedicat6rias

Dedicalórias

A **Deus**, antes de qualquer coisa.
Por me manter fiel e por não me deixar desistir, nunca.

Aos meus pais **Catarina Piedade Bueno e Alício Camargo Bueno**. Por todo amor, incentivo, dedicação e paciência. A vida toda dedicarei minhas vitórias a vocês.

À **Débora Cristina Damasceno**, minha orientadora. Por ser amiga e conselheira, mas também por me acolher e me apresentar o caminho da ciência praticada com amor e honestidade.

Agradecimientos

Agradecimentos

À **minha família**. Meus pais, meus irmãos, Silvio Bueno e Iara Cristina Bueno e seus respectivos cônjuges: Camila Francisco e Gustavo Furlan e meus sobrinhos muito amados Sofia e Pedro. Agradeço por todo carinho e apoio. Pela paciência nos momentos em que estive ausente por conta do trabalho e por apostarem no meu potencial. Além disso, agradeço pela segurança de poder contar com vocês, por caminharem comigo todos os dias da minha vida e pela certeza de que, mesmo seguindo caminhos tão distintos eu sempre vou ter para onde voltar.

As minhas roommates e amigas, **Bianca e Cíntia**. Obrigada pela paciência de Jó, pelos conselhos, conversas e ajuda nos momentos em que precisei. Amo vocês!

Ao meu namorado e companheiro, **Gerson Henrique Tieghi Rosa**, por aceitar a proposta Divina de caminhar comigo.

À **Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela proveitosa parceria estabelecida e por me socorrer de imediato nos momentos em que precisei.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia** (LAPGO) pela acolhida e concessão das dependências e aparelhos durante a realização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Felipe Perecin**, pela disposição em me ajudar prontamente todas as vezes em que tive dúvidas sobre como proceder;

Aos membros da minha banca do exame de qualificação: **Prof. Dr. Wellerson Scarano e Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim**;

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**: Janete Aparecida Nunes Silva, Diego Cezario Bovolim de Oliveira, Andrea Paula Longo Devidé, Bruna Quirino da Silva Jorgetto, Lilian Cristina Nadal,

Agradecimentos

Solange Sako e Vanessa Moraes Braite pela simpatia e solicitude durante o período de pós-graduação;

A todos os **funcionários da Medicina experimental** em especial ao Danilo Chaguri, Carlos Roberto, Arlindo Gabriel, Talísia Moretto e Vickeline Namba por todo o suporte oferecido a mim e ao meu projeto.

Ao serviço da **Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação** da Unesp, Campus de Botucatu pelo auxílio na elaboração da ficha catalográfica;

Aos docentes e funcionários do **Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP)** em especial ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**;

À **Profa. Dra. Terezinha Peraçoli** e sua aluna **Camila Ferreira do Instituto de Biociências de Botucatu** por colaborarem prontamente com a adaptação de seu protocolo para desenvolvimento em nosso laboratório;

À **Universidade de Medicina de Harvard**, especialmente ao **Joslin Diabetes Center**, pelo acolhimento durante o desenvolvimento da pesquisa no exterior.

À **Profa. Dra. Mary Loeken**, pela paciência e pelo tempo dedicado a me ajudar e ensinar.

Aos **amigos de convivência diária do LAPGO**: Aline de Oliveira Netto, Fernanda Piculo, Giovana Vesentini, Franciane Quintanilha Galego Souza, Rafael Bottaro Gelaleti, Ana Paula Campos, Carolina Abreu e Eduardo Kloppel.

À **Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato**, por toda atenção dispensada a mim nos últimos anos.

Agradecimentos

Aos meus **amigos de laboratório** Dong, Jiin, Lis, Huyjuan, Kaitlyn, Flora, Yunfei, Hooi Myn, Giorgia e Giovane. Eu não tenho palavras para vocês. I miss you all every single day.

Aos membros do grupo **Santo Inácio de Loyola** que sem dúvida alavancou muitos dos meus dias difíceis através da oração.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pela concessão da bolsa (Processo n°. 2011/23721-0); auxílio regular (Processo n°. 2012/17275-0); e bolsa de estágio no exterior_BEPE (Processo n°. 2013/16548-5);

E também, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Capítulo 1

EARLY EMBRYO REDOX STATUS ACCORDING TO THE EXPERIMENTAL MODEL OF MATERNAL DIABETES

Bueno A¹, Perecin F², Loeken MR³, Rodrigues T⁴, Sinzato YK¹, Damasceno DC¹

¹Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Graduate Course on Gynecology, Obstetrics and Mastology, Botucatu Medical School, Unesp_Univ Estadual Paulista, São Paulo State, Brazil.

²Basic Sciences Department, Animal Husbandry and Food Engineering School, USP_Univ Estado de São Paulo, São Paulo State, Brazil.

³Islet Cell and Regenerative Biology, Joslin Diabetes Center_ HMS_Harvard Medical School, Boston, Massachussets, USA.

⁴Center of Natural and Human Sciences (CCNH), Federal University of ABC (UFABC), Santo André, São Paulo State, Brazil.

***Correspondence to:**

Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP. 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil
Fone/Fax: (55 14) 38801630
Email: damascenofmb@gmail.com

Abstract

Early embryos recovered from diabetic rats show increased number of blastomeres undergoing apoptosis and decreased total number of blastomeres, suggesting impaired litter size and newborn weight. This might increase the chances of metabolic disorders in adulthood of these animals. Since diabetes-induced hyperglycemia impairs the redox balance, the aim was to evaluate the embryonic oxidative stress status before the implantation in order to identify whether there are differences in levels of oxidative stress in early embryos from diabetic dams. Thus, we hypothesized the decreased cell number found in early embryos recovered from diabetic rats is due to the low embryonic ability to maintain their own redox balance. Our study shows that rats with streptozotocin-induced mild and severe diabetes present impaired redox status in early pregnancy. This maternal unbalance directly influences the embryonic redox status, reflecting the increased reactive oxygen species in the morula stage. We also showed that regardless of hyperglycemic level the embryos trigger defense mechanisms involved in the excessive free radical scavenging as an attempt to survive. Nevertheless, the success of this defense mechanism seems to depend on maternal hyperglycemia, highlighting the importance of the programmed pregnancy as well as appropriate medical care starting in early stages of human diabetic pregnancy.

Key words: Glutathione, morula, free radicals, hyperglycemia, rats.

Highlights:

- Diabetes is related to redox balance changes,
- Maternal severe diabetes led to decreased GSH levels in morulae,
- Relationship between decreased GSH content in morulae and quality and redox status of maternal oocytes.

Introduction

Oocytes and preimplantation embryos produce reactive oxygen species (ROS), which have an important role in the embryonic development and implantation. However, if too much ROS are produced or if free radical scavenging is limiting, the normal development can be blocked [1]. The metabolism of molecular oxygen is important in embryos [2-4]. The average oxygen consumption rate of bovine morulae and blastocysts is approximately two nanoliter per embryo per hour [5]. The major ROS produced by embryos are superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) [6]. ROS generation varies according to embryo development stage [7]. ROS may be generated directly by embryos, from their surroundings such as cumulus cell and from maternal oviduct. Therefore, several ROS defense mechanisms are present in both embryos and their surroundings. In vivo, oocytes and embryos seem to be protected against oxidative stress by oxygen scavengers present in follicular and oviductal fluids. Oxidative damage may result from overproduction and/or decreased clearance of ROS by the scavenging mechanisms [1]. Scavenging oxidative molecules have been defined as “any substance that when present at low concentrations compared to that of oxidizable substrate significantly delays or inhibits oxidation of that substrate” [8]. This definition includes compounds of a non-enzymatic as well as an enzymatic nature [1]. Reduced glutathione (GSH) appears to be the main non-enzymatic defense system against ROS in embryos [9-11]. GSH is also the substrate of glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme, which reduces [lipid hydroperoxides](#) to free [hydrogen peroxide](#) in cells. Synthesis of GSH during oocyte maturation has been reported in mouse, hamster, porcine, and bovine oocytes [12]. This increase in GSH content provides oocytes with large GSH stores available for decondensation of the sperm nucleus, and also protects the embryo against ROS until the blastocyst stage [13]. ROS must be continuously inactivated in embryos and this occurs both from intracellular free radical scavenging and external scavenging within the oviductal environment. Oxidative stress seems responsible for numerous types of embryo damage. Lipid peroxidation can inhibit cell division, metabolite transport and cause mitochondrial dysfunction. In addition, ROS can break nuclear DNA strand. The consequences of molecular oxidation include retardation and arrest of embryo development, disturbed fuel metabolism, and apoptosis [16-20].

Gardiner et al. [21] have shown a 10-fold decrease in total glutathione content during the first 4 days of mouse embryonic development. This suggests that some stages of preimplantation development may be more sensitive than others to chemicals or environments that can cause oxidative stress. During morula compaction, blastomeres differentiate into trophectoderm (which gives rise to the extraembryonic membranes, including the fetal placental face of the placenta) and the pluripotent inner cell mass (ICM, which gives rise to the embryo proper).

Some disease conditions, such as *Diabetes mellitus* during pregnancy, also change the embryonic cellular redox status. Maternal diabetes causes oxidative stress due to high blood glucose level-induced biochemical disturbances contributing to embryotoxicity [25]. In general, preimplantation loss may be attributed to abnormal gametes, suboptimal condition in the reproductive tract, or abnormal embryos [26]. Some experimental rodent models of diabetic pregnancy show reduced number of embryos reaching the blastocyst stage, and fetal viability rate. In addition, there are reports of increased rates of arrested embryos (37.7% versus 11%) [27 -29]. Chang et al. [31] have shown that oxidative stress is able to inhibit post implantation embryo Pax-3 expression during diabetic conditions. Thus, oxidative stress could present similar mechanisms before the implantation such as expression of genes required for proper blastocyst formation and these events could be involved on adverse effects of oxidative stress on preimplantation embryos.

The hypothesis of this study was that the effects of maternal hyperglycemia on the developing preimplantation embryos is due to some embryos could be more exposed to oxidative stress during early stages of development. Therefore, a sequence of events triggered by impaired embryonic antioxidant defense systems could explain the abnormal development during diabetic pregnancy. Thus, the aim of the present study was to evaluate the embryonic oxidative stress status before the implantation in order to identify whether there are differences in levels of oxidative stress in early embryos from diabetic dams.

Materials and Method

Animals and experimental groups

Male and female Sprague-Dawley rats (75 days of age) were purchased from State University of Campinas (UNICAMP, São Paulo, Brazil) and kept under controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and lighting (12h light/12h dark cycle), with free access to food and water in the vivarium. The mating to obtain newborns to perform the diabetic induction has been performed in our lab by submitting four females per cage to a male presence overnight. In the following morning, the vaginal smear was performed to confirm the pregnancy diagnostic. The animals were randomly distributed into four experimental groups: mild diabetes (MD - diabetes induced at birth), nondiabetic (NDMD -control for mildly diabetic group), severe diabetes (SD - diabetes induced in adulthood) and other nondiabetic group (NDSD – control for severely diabetic group). The study was approved by the institution's Animal Research Ethics Committee and the animals were treated in accordance with the Brazilian College of Animal Experimentation Guidelines (Permit Number: 939/2012).

Diabetes induction

Severe diabetes (SD) was induced in adult female rats (90 days of age) by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, Millstone, USA), at a dose of 50 mg/kg (0.1M sodium citrate, pH 4.5). The inclusion criteria for severely diabetic group were rats with glycemia $\geq 300\text{mg/dL}$ [32]. Mild diabetes (MD) was induced in female newborn (NB) at birth (day 0) after single subcutaneous injection of STZ (100 mg/kg). Five days after STZ injection glycemia was measured and rats presenting glycemia $\geq 400\text{mg/dL}$ [27]. The respective non-diabetic groups were given citrate buffer using the same volumes and routes of injection as their respective diabetic groups. The inclusion criteria for control groups were rats with glycemia $< 120\text{mg/dL}$ at adulthood [33] (Figure 1).

Mating and pregnancy

All adult female rats (110 days of life) of different experimental groups (NDMD, MD, NDSD and SD) were mated overnight with non-diabetic males. The morning when spermatozoa were found in the vaginal smear was designated as gestational day zero (D0). After mating, the females were kept in individual cages and blood glucose levels were measured from a cut tip tail in the afternoon of D0 and D3 using a One-Touch Ultra Glucometer (Life Scan, Johnson and Johnson®). At D2 of pregnancy an oral glucose tolerance

test (OGTT) was performed. Blood glucose levels are measured before (time point 0) glucose solution (200 g/L) administrated by gavage at a final dose of 2 g/kg body weight, and again at 30, 60, and 120 minutes after the injection. Following that, the blood samples were obtained from a cut tip tail for blood glucose measurements [34]. OGTT was performed only for MD and NDMD rats. This test was not performed with SD rats because these animals have diabetes status already established in previous studies in our lab. Glucose responses during the glucose tolerance test were evaluated by estimation of the total area under the curve (AUC), using the trapezoidal method [35].

Maternal oxidative stress status and serum insulin concentration

Between 8:00 and 11:00 AM on D3, pregnant rats were anesthetized with sodium thiopental (Thiopentax® - Cristalia Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brazil) and humanely killed by anesthesia overdose and decapitation. Three milliliters of maternal blood samples were collected from the trunk in tubes with anticoagulant (heparin) from each rat. Then the samples were centrifuged at 90xg for 10 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the erythrocytes were washed with phosphate buffered saline (PBS) followed by centrifugation at 263xg for 1 minute at 4°C. This procedure was repeated 3 times and final infranatants were used for the measurement of SOD and GSH-Px activities, MDA and reduced thiol group concentrations as described [36 – modified]. Another blood samples (5mL) were collected for serum insulin measurement.

Embryo recovery (D3 of pregnancy)

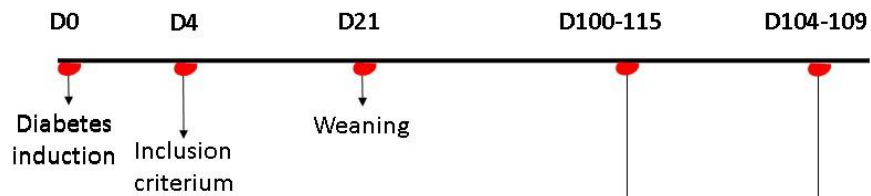
The uterus was removed of each rat for morula recovery by flushing each uterine horn with 1.0mL of pre warmed mR1ECM-pva (Fig. 1) [37].

Embryonic redox status measurement

Protocols for assay of oxidative stress markers have been developed in our lab. For H₂O₂ analyses, embryos were immediately removed from media and incubated in 5uM CM-H2DCFDA (Molecular Probes - Invitrogen®) diluted in D-PBS drops at 37°C for 10 minutes. After that, embryos were washed in D-PBS drops and incubated for 20 minutes in mR1ECM-pva at 37°C. For GSH, the probe chosen was Thiol Tracker Violet, which is a fluorescent

probe that reacts with thiols and can be used as an effective marker for intracellular GSH and overall redox state [38]. Morulae were incubated in 20 μ M Thiol Tracker Violet (Molecular Probes - Invitrogen), which was diluted in D-PBS drops at 37°C for 30 minutes. Subsequently, embryos were washed in D-PBS drops and incubated for 20 minutes in mR1ECM-PVA at 37°C. For the fluorescence analyzes we used the fluorescence microscopy, excitation/emission for CM-H2DCFDA and Thiol Tracker Violet was 492-495/517-527nm and 404/526nm, respectively. All These procedures were performed in the dark and the incubations were performed under controlled gas tensions (5% CO₂ and 5% O₂) respecting the early stage of development. Images were captured and analyzed by Image J® - NIH software used for getting information from images, including pixel intensity.

Mild Diabetes



Severe Diabetes

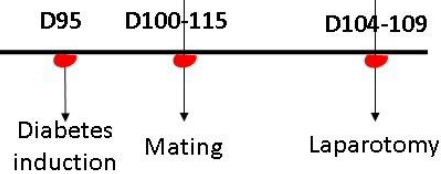


Fig. 1. Experimental design for severe and mild diabetes induction, inclusion criteria, mating and pregnancy. Control groups were performed following the same protocols, injected citrate buffer.

Statistical analyses

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. For normal distribution and considering homogeneity of groups (NDMD x NDSD; NDMD x MD; NDSD x SD, and MD x SD), ANOVA followed by t test was performed. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

The insulin concentrations were measured to determine if diabetic rats were insulin deficient during early pregnancy. Insulin concentrations were decreased in both MD and SD pregnant rats compared with their respective control groups. In addition, insulin concentrations of the SD group was further decreased compared with those of MD rats (Fig. 2).

To evaluate the diabetes status during the early pregnancy, a glucose challenge was administered at D2 of pregnancy to the MD group. In the OGTT, the blood glucose levels were increased at all time points compared with those of NDMD and compared with the first time point (fasting). The area under the curve was calculated in order to establish a quantitative correlation between groups, and it was significantly increased in rats with MD in relation to that of control group (Fig. 3A and 3B).

The maternal oxidative status was assessed by measuring activities of the free radical scavenging enzymes, SOD and GSH-Px activities in washed erythrocytes (Fig. 4A and 4B). Both SOD and GSH-Px activities were decreased in the SD group compared with those of NDSD and MD groups. To determine the extent of lipid and protein oxidation, MDA and reduced thiol group concentrations were measured (Fig. 5A and 5B). The SD rats displayed increased MDA concentrations and decreased thiol content in relation to those of NDSD and MD groups.

The morulae of the MD group displayed a slight decrease of GSH concentrations compared with that of the NDMD. However, no significant difference was observed. The morulae of the SD group presented a lower fluorescent intensity in GSH in relation to NDSD and MD groups. This GSH depletion in morulae of SD group reflected in a higher hydrogen peroxide fluorescent intensity relative to those of NDSD and MD groups (Fig. 6).

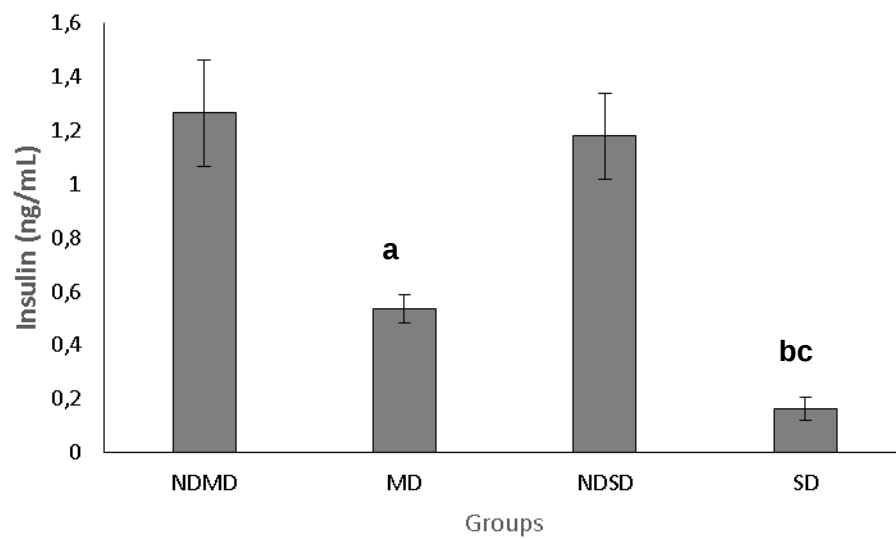


Fig. 2. Serum insulin concentrations of mildly and severely diabetic and respective non-diabetic rats at day 3 of pregnancy (n=13 rats/group).

Data shown as mean $\pm$ standard deviation

*p < 0.05 - NDMD x NDSD

^ap < 0.05 - NDMD x MD

^bp < 0.05 - NDSD x SD

^cp < 0.05 - MD x SD

ANOVA followed by t test

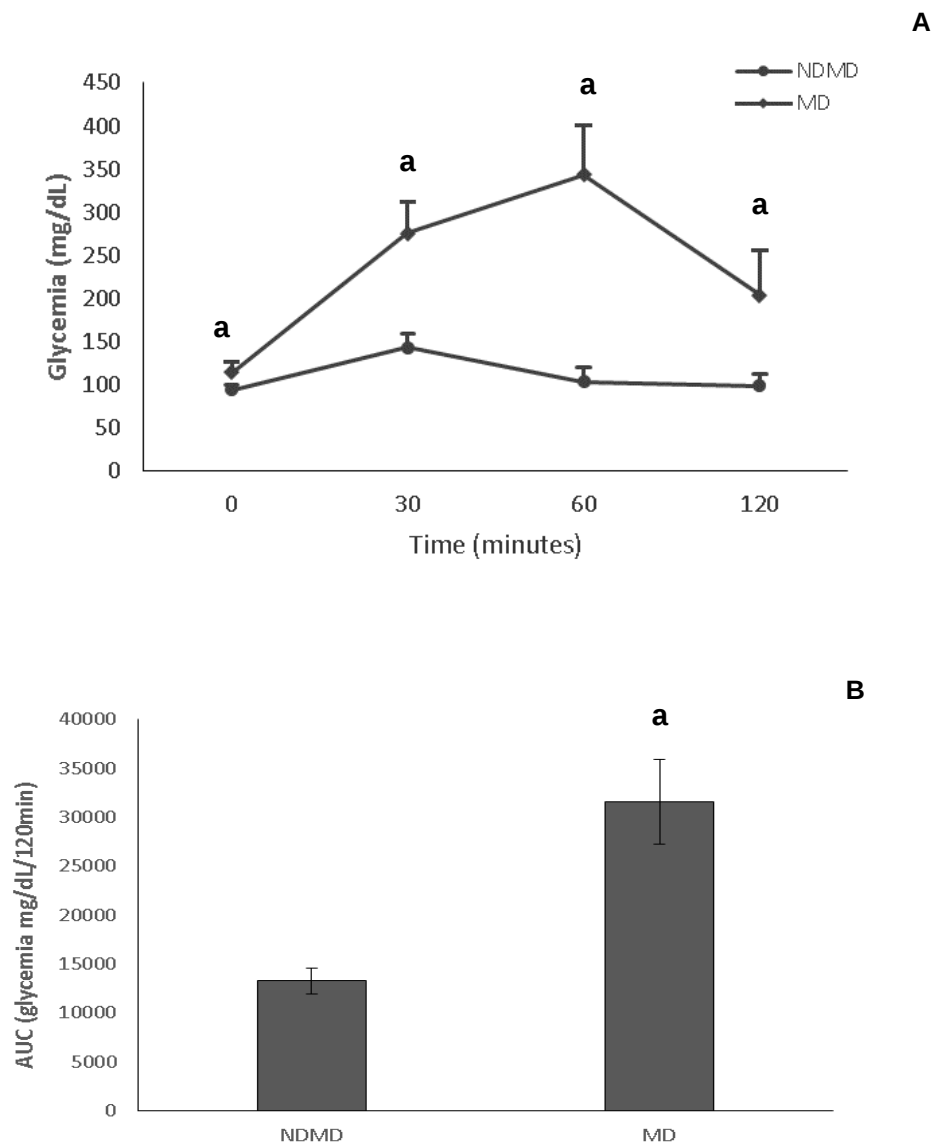


Fig. 3. A - Oral glucose tolerance test (OGTT) of mildly and severely diabetic and respective non-diabetic rats day 2 of pregnancy (n=13 rats/group). B - Area under the curve (AUC) of mildly and severely diabetic and respective non-diabetic rats at day 2 of pregnancy.

Data shown as mean $\pm$ standard deviation

^ap < 0.05 - NDMD x MD (ANOVA followed by t test)

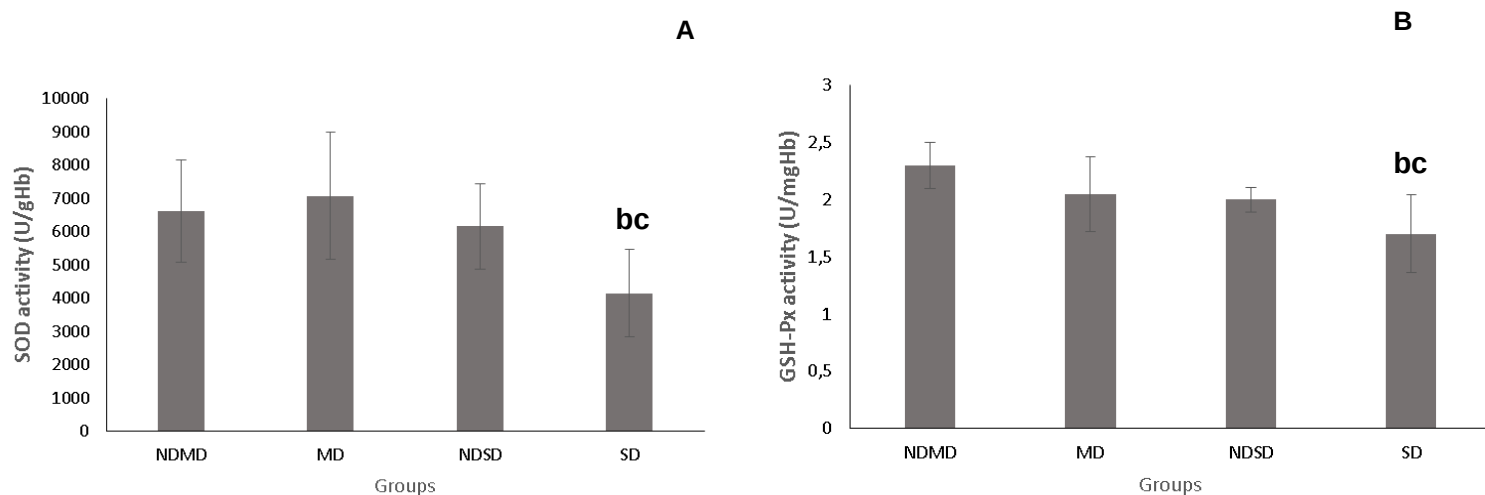


Fig. 4. A - Superoxide dismutase (SOD) activity, B - Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activity in washed erythrocytes of mildly and severely diabetic and respective non-diabetic rats at day 3 of pregnancy (n=13 rats/group).

Data shown as mean $\pm$ standard deviation

* $p < 0.05$ - NDMD x NDSD

^a $p < 0.05$ - NDMD x MD

^b $p < 0.05$ - NDSD x SD

^c $p < 0.05$ - MD x SD

ANOVA followed by t test

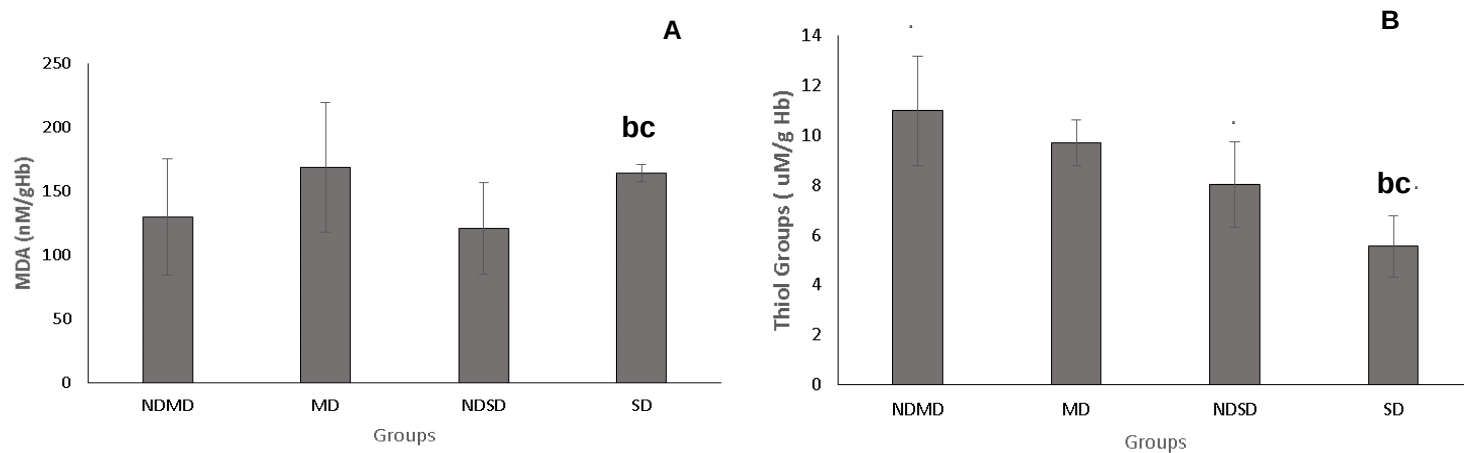


Fig. 5. A - Malondyaldeyde (MDA) concentration, B – Reduced thiol group concentrations in washed erythrocytes of mildly and severely diabetic and respective non-diabetic rats at day 3 of pregnancy (n=13 rats/group).

Data shown as mean $\pm$ standard deviation

* $p < 0.05$ - NDMD x NDSD

^a $p < 0.05$ - NDMD x MD

^b $p < 0.05$ - NDSD x SD

^c $p < 0.05$ - MD x SD

ANOVA followed by t test

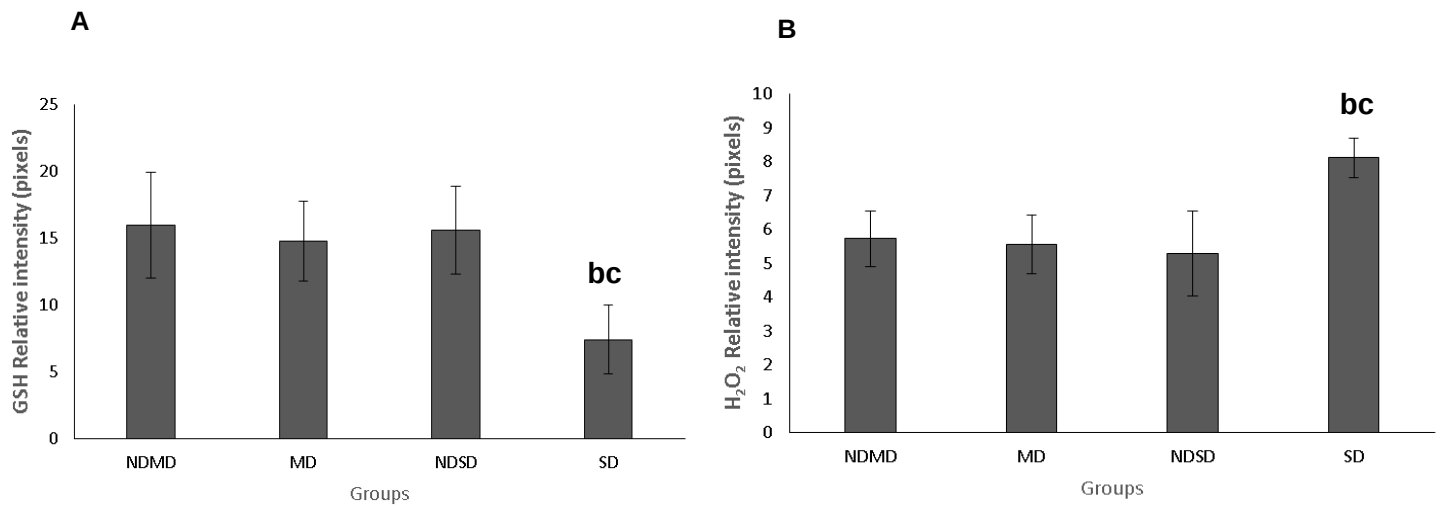


Fig. 6. Relative fluorescence intensity after incubation of rat morulae of mildly, severely diabetic and respective non-diabetic rats after treatment GSH (A) and hydrogen peroxide (B) probes (n=33 morula/group/probe). The relative intensity is presented by the ratio between absolute intensity and pixel number per embryo.

Data shown as mean $\pm$ standard deviation

*p < 0.05 - NDMD x NDSD

^ap < 0.05 - NDMD x MD

^bp < 0.05 - NDSD x SD

^cp < 0.05 - MD x SD

ANOVA followed by t test

Discussion

This study was undertaken to determine whether the early embryo is capable to protect itself from maternal diabetes-induced changes in the uterine environment. Given that diabetes is related to changes in the balance between production and removal of reactive oxygen species, we studied the relationship between embryo redox status and maternal diabetes-induced changes. In both diabetic groups (MD and SD), OGTT, blood glucose levels and AUC were compatible with those expected when using the methods employed in this study for the induction of mild and severe diabetes [39].

Mild Diabetes

The MD rats showed lower serum insulin concentrations than NDMD. There is evidence that rodents stimulated during the first weeks after birth show impressive β -cell proliferation capacity [40]. In spite of such capacity, diabetic rats showed high glycemic levels at all time points (0, 30, 60 and 120 minutes) of OGTT, which confirmed the diabetic status. Moreover, AUC calculation showed that the amount of glucose circulating in one deciliter of blood was 263mg per minute, once again confirming the rats' diabetic status. Nonetheless, this glucose concentration was not high enough to cause maternal oxidative stress, as confirmed by measures of MDA and reduced thiol group concentrations, as well as enzymatic activity of SOD, and GSH-Px, which seem to respond to the hyperglycemic insult in early pregnancy.

Our results show that embryos collected from diabetic rats during the morula stage present slightly decreased GSH concentration. This might have resulted from the mobilization of GSH storage as a form to decrease hydrogen peroxide levels. GSH is the major intracellular nonprotein thiol in embryonic cells that plays an essential role against oxidative damages [41], and thus improves embryo development and quality [41,42]. GSH intracellular synthesis occurs during oocyte maturation [43] and depends on cysteine availability [44]. The literature shows that the preimplantation mouse embryo does not have the capacity for *de novo* synthesis of GSH until the blastocyst stage [10], and that a greater use of GSH storage is likely to protect blastomeres from oxidative stress, particularly at a time when the embryo appears to be more sensitive as it undergoes the maternal-zygotic

genome switch [45]. However, once maternal GSH stores provided to the embryo through the oocyte, are depleted, there is no mechanism for GSH concentration recovery [46]. These reports corroborate our findings that GSH was used to protect blastomeres maintaining the redox status balance to ensure adequate embryo development. As the rats with mild diabetes are capable of maintaining their redox status, their embryos seem to have the same capacity. However, another study conducted at our lab demonstrated that the number of blastomeres was lower in embryos recovered from rats with mild diabetes [27] even the present study showing the redox state is controlled. Thus, even though the oxidation molecules scavengers are recruited to maintain a balance of the redox status, this event does not ensure the blastomere protection during the early development.

Trying to better understand the early development in high glucose concentration environment, Descalzo et al. [47] cultured murine ESC in medium containing high glucose concentrations. The exposure to varying glucose concentration modulated cell growth, increasing the proliferative nature of short-term (24 hours) glucose-challenged cells. However, as the cells continued in high glucose culture (5 days), the pattern appeared to reverse, resulting on fewer cells after longer glucose exposure. According to these authors, c-jun NH2-terminal kinase (JNK) activation appears to stimulate the glucose exposure-mediated nuclear presence of forkhead box O transcription factor (FOXO), specifically FOXO3a. In hyperglycemic conditions, the immediate increase in ROS generation promotes JNK activation leading to nuclear activation of FOXO3a/CTNNB1 complex, which stimulates promoters of genes that regulate ROS removal. On the other hand, this complex also regulates cyclin-dependent kinase inhibitor, blocking the cell cycle and reducing cell proliferation. This mechanism can explain our previous data that show decreased blastomeres in embryos recovered from diabetic rats [22]. In addition, these findings suggest that this mechanism is activated in late stages of preimplantation development (blastocyst stage), when there is increased embryonic gene transcription, but not in morulae stage, as we are studying now, because morulae are depend on maternal transcripts. It is worth highlight that both mild diabetic dams and their embryos (morulae stage) are able to maintain the redox balance, but this information does not mean they are no affected by diabetes adverse outcomes.

Severe Diabetes

Severely diabetic rats did not undergo to OGTT because they had fasting or pre-prandial glycemia > 600 mg/dL [27], and glucose overload could cause their death. In our study, SD rats showed oxidative stress with decreased antioxidant enzyme activity that led to oxidative damage to lipids and proteins. Oxidative stress in uncontrolled diabetes arises from a variety of mechanisms such as excessive oxygen radical production from auto-oxidation of glucose, glycated proteins, and glycation of antioxidant enzymes, which limit their capacity to detoxify oxygen radicals, and shifts in redox balances, decreased concentrations of antioxidants and impaired activities of antioxidant defense enzymes, such as SOD, GSH-Px and catalase [48].

The polyol pathway is another mechanism that has been suggested as being responsible for the generation of oxygen radicals in uncontrolled diabetes. It is based on the aldose reductase enzyme, which uses a wide variety of carbonyl mixtures as substrates, and reduces them to their respective sugar alcohols, by binding to NADPH. In the presence of the coenzyme NADPH, aldose reductase reduces glucose to sorbitol. As NADPH is a cofactor required to regenerate GSH, a decreased NADPH availability leads to low GSH content, which may induce or exacerbate intracellular oxidative stress [49]. Furthermore, ketosis, a hallmark of type 1 *Diabetes mellitus* in particular, has been reported to increase oxygen radical production in diabetic patients with uncontrolled hyperglycemia [50], similarly to animals with severe diabetes chemically induced by streptozotocin [39].

Following the statement that morulae recruit maternal transcripts to maintain the redox balance [1] and considering the maternal SD condition showed in our study, embryos from females with severe diabetes presented increase in hydrogen peroxide levels and a decrease in GSH levels, confirming the impaired the redox balance, similarly to their dams.

Oocyte cultured in high glucose concentrations present decreased GSH content. This result is explained by an impairment of gamma-glutamylcysteine synthetase activity caused by glucose [51]. Thus, the decreased GSH content in morulae from rats with severe diabetes might be associated to the quality and redox status of maternal oocytes.

On the other hand, low insulin concentrations caused by streptozotocin-induced beta-pancreatic cell death reduce intracellular glucose uptake in oocytes, and it is possible that hyperglycemia may disturb the metabolism of granulosa cells, and such adverse effects

are then transferred into oocytes [52]. In this view, we suggest that even if glucose levels are decreased in the oocyte, this condition would decrease the availability of NADPH by the pentose phosphate pathway and with no NADPH enough, there is no GSH recycle from GSSG, decreasing GSH storage (Fig. 9). Thus, decreased GSH content in early stage of embryonic development would be directly related to the oocyte of rats with severe diabetes. Therefore, intracellularly, oocytes are sensitive to high glucose concentration as much as to low glucose, showing the important role of the hyperglycemia control in reproductive issues on diabetes.

In addition to cytosolic changes, Wang et al. [53] showed that maternal diabetes (glycemia $\geq 300\text{mg/dL}$) results in structural and spatial dysfunction of mitochondria from oocytes, which may be manifested later as developmental abnormalities or lethality in preimplantation embryos. This corroborates our previous finding of arrested development in 34% of embryos from rats with severe diabetes compared with 11% from controls (Bueno A, unpublished data). In addition, maternal transmission of mitochondria with mutations in their genome is the genetic basis for the inheritance of certain metabolic disorders [54] and although during the early development the embryos use pyruvate and lactate synthesis, morulae are able to oxidize glucose which is uptaken by GLUT1 and GLUT3 and increasing the intracellular glucose concentration to cells which inherited mitochondrial dysfunction could increase the hydrogen peroxide production, impairing the embryonic redox status [22]. Thus, the inheritance of maternal cytosolic metabolism and mitochondrial dysfunctions would change the redox status in early stages of embryo development.

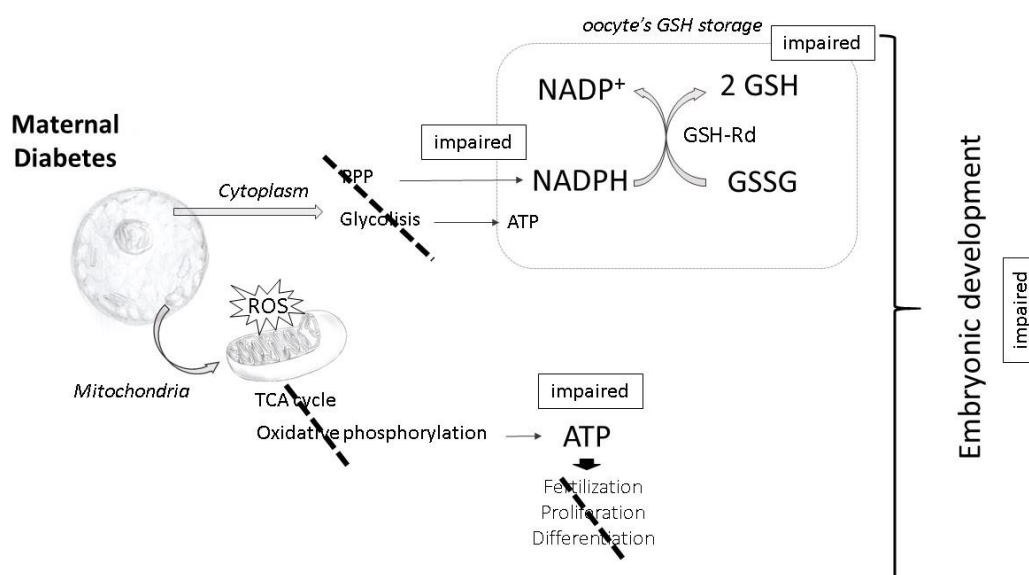


Fig. 9. Graphical Abstract - *Possible mechanisms involved in early development failure in embryos from diabetic rats.* As hyperglycemia inhibits the pentose phosphate pathway activity, GSH storage in the female germ cell is compromised affecting the GSH store necessary to ensure the survival of the early embryo. Additionally, the oxidative stress generated by hyperglycemia causes mitochondrial disturbances reducing ATP production that might lead to embryo development arrest. (PPP = pentose phosphate pathway; TCA cycle: tricarboxylic acid cycle)

In addition, given that embryos do not have the capacity for *de novo* GSH synthesis [10], the altered maternal environment might favor total GSH depletion, making the embryo susceptible to maternal severe diabetes-induced damage. These findings might explain our previous results regarding the reduction in the number of live fetuses and cells per embryo, as well as decrease in the rate of viable embryos among rats with severe diabetes [28]. Hence, impaired glucose metabolism in the germ cell can be the main cause of the adverse embryofetal repercussions found in severe diabetes.

There are no studies evaluating the quality of GSH store in the oocytes or embryos from these diabetic animals not even the NADPH production and availability. Thus, the cause of decreased GSH level cannot be determined. Nonetheless, it is possible that the GSH storage is affected by the maternal condition and that, although the embryonic GSH store is mobilized, such protective attempt fails because the level of GSH available is too low. This

decreased level is clearly due to some type of abnormality in the maternal metabolism that culminates in germ cell alterations in rats with severe diabetes. In order to test this statement, studies are underway to assess the quality of oocytes and GSH store in rats with different hyperglycemic conditions.

Conclusion

In this study, despite of a hyperglycemic insult, the embryos recruit GSH as a defense mechanism to survive and reach implantation regardless the hyperglycemic levels. It is noteworthy that although such defense may not be very effective in some hyperglycemic conditions due to the maternal condition and embryonic inheritance, implantation may be still attempted. Nonetheless, the development of these embryos may be impaired and/or reprogrammed due to maternal conditions and/or to unexpected GSH content recruitment, resulting on embryonic pre- and post-implantation losses, fetal birth defects or disease in adulthood. This can be often observed in clinical practice as well as in experimental studies on diabetes. Moreover, since the maternal condition seems to directly influence the redox status of the embryo, the importance of a tight glycemic control before and during diabetic pregnancy is highlighted.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: AB, DCD, FP.

Performed the experiments: AB, YKS. Analyzed the data: AB, DCD, YKS, TR, ML.

Contributed reagents/materials/analysis tools: DCD. Wrote the paper: AB, DCD, ML.

Competing interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr Mary Loeken (Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston) for contribution in writing this manuscript; Dr Jose Eduardo Corrente (Research Support Office, Botucatu Medical School, Unesp) for statistical analysis; Mariza Branco for English review; Ana Paula Campos (Under graduate student) for oocyte and mitochondria drawing; Talísia Moretto and Danilo Chaguri (Academic Support Technician, Unesp) for animal care and FAPESP for financial support (Protocol Numbers 2013/16548-5, 2012/17275-0 and 2011/23732-0).

References

- [1]. Guérin P, El Mouatassim S and Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7(2):175-89.
- [2]. Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L *et al.* Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum Reprod* 1986; 1:183-184.
- [3]. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ *et al.* Oxygen Consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1996; 44:476-485.
- [4]. Thompson JGE, Partidge RH, Houghton FD *et al.* Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1996; 106:299-306.
- [5]. Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky J *et al.* Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocysts. *Theriogenology* 1992; 37:269.
- [6]. Manes C and Lai MC. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J Reprod Fertil* 1995; 104:69-75.
- [7]. Nasr-Esfahani MH, Winstin NJ and Johnson MH. Effect of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tensions on the concentrations of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 96:219-231.
- [8]. Halliwell B and Gutteridge JMC 1989. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: Halliwell, B and Gutteridge JMC (eds). *Free radicals in Biology and Medicine* 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, pp 22-85.
- [9]. Takahashi M, Nagai T, Hamano S *et al.* Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 1993; 49:228-232.
- [10]. Gardiner CS, Reed DJ. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318(1):30-36.
- [11]. Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ *et al.* Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod* 1998; 59(2):431-436.
- [12]. Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev* 1993; 35(1):76-81.

- [13]. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF *et al.* Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(4):451-457.
- [14]. Zuelke KA and Perreault SD. Hamster oocyte and cumulus cell glutathione concentrations increase rapidly during in vivo meiotic maturation. *Biol Reprod* 1994; 50(1):144.
- [15]. Funahashi H and Day BN. Effects of cumulus cells on glutathione content of porcine oocyte during in vitro maturation. *J Anim Sci* 1995; 73(1):90 (abstract).
- [16]. Kowaltowski AH and Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 1999; 26:463-471.
- [17]. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y *et al.* Involvement of superoxide radicals in the mouse 2 cell block. *Mol Reprod Dev* 1991; 28:356-360.
- [18]. Munné S and Estop A. Superoxide anion increases after sperm storage and produces chromosome abnormalities. *Biol Reprod* 1991; 44:681-687.
- [19]. Nasr-Esfahani MH, Aitken RJ and Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development* 1990; 109:501-507.
- [20]. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R *et al.* Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1985; 1271:67-74.
- [21]. Gardiner CS and Reed DJ. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 1994; 51:1307-1314.
- [22]. Pantaleon M and Kaye PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod* 1998; 3:77-81.
- [23]. Leese, HJ and Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1984; 72:9-13.
- [24]. Shyh-Chang NG, Daley CG and Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 2013; 140:2535-2547.
- [25]. Wentzel P, Thunberg LA and Eriksson UJ. Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia* 1997; 40:7-14.

- [26]. Klein J and Stein Z. Epidemiology of chromosomal anomalies in spontaneous abortion: prevalence, manifestation and determinants. In: Spontaneous and recurrent abortion, Bennett MJ, Edmonds DK (eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987. p.29.
- [27]. Bueno A, Sinzato YK, Sudano MJ *et al.* Short and long-term repercussions of the experimental diabetes in embryofetal development. *Diabetes Metab Res Rev* 2014; 30(7):575-81.
- [28]. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A *et al.* Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res* 2013; 473575.
- [29]. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK *et al.* Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1(1):21.
- [30]. Phelan SA, Ito M and Loeken MR. Neural tube defects in embryos of diabetic mice role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes* 1997; 46(7):1189-1197.
- [31]. Chang TI, Horal M, Jain SK *et al.* Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 2003; 46(4):538-545.
- [32]. Corvino SB, Netto AO, Sinzato YK *et al.* Intrauterine growth restricted rats exercised at pregnancy: Maternal-fetal repercussions. *Reprod Sci* 2015; 22(8):991-9.
- [33]. Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL *et al.* Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res* 2012; 108163.
- [34]. Santos TM, Sinzato YK, Gallego FQ *et al.* Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. *Cell Stress Chap* 2015; 20(4):595-603.
- [35]. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 1994; 17(2):152-154.
- [36]. De Souza MD, Sinzato YK, Lima PH *et al.* Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod Biomed Online* 2010; 20(4):547–552.
- [37]. Cozzi J, Wang E, Jacquet C *et al.* Procedures for somatic cell nuclear transfer in the rat. *Methods Mol Biol* 2010; 597:137-50.
- [38]. Mandavilli BS and Janes MS. Detection of intracellular glutathione using Thiol Tracker violet stain and fluorescence microscopy. *Curr Protoc Cytom* 2010; 9:9-35.

- [39]. Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL *et al.* Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res Int* 2014; 2014:819065.
- [40]. Lysy PA, Weir GC and Bonner-Weir S. Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(2):150-159.
- [41]. Hammond CL, Lee TK and Ballatori N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 2001; 34:946–954.
- [42]. Luvoni GC, Keskindepe L and Brackett BG. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev* 1996; 43(4):437-443.
- [43]. De Matos DG, Gasparrini B and Pasqualini SR *et al.* Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002; 57, 1443-1451.
- [44]. Richman PG and Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 1975; 250(4):1422-1426.
- [45]. Lee MT, Bonneau AR and Giraldez AJ. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30:581–613.
- [46]. Xie HL, Wang YB, Jiao GZ *et al.* Effects of glucose metabolism during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Sci Reprod* 2016; 6:20764.
- [47]. Descalzo DLM, Satoorian TS, Walker LM *et al.* Glucose-induced oxidative stress reduces proliferation in embryonic stem cells via FOXO3a/b-Catenin-dependent transcription of p21cip1. *Stem Cell Reports* 2016; 7:55–68.
- [48]. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA *et al.* The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *SQU Med J* 2012; 12(1):5-18.
- [49]. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010; 107(9):1058-70.
- [50]. Jain SK, McVie R, Bocchini Jr JA. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology* 2006; 13:163–170.
- [51]. Hashimoto S, Minami N, Yamada M *et al.* Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 2000; 56(4):520-6.
- [52]. Acevedo N, Ding J and Smith GD. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2007; 77:872–879.

- [53]. Wang Q, Ratchford AM, Chi MMY *et al.* Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Mol Endocrinol* 2009; 23(10):1603–1612.
- [54]. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004; 128:269–280.

Capítulo 2

Estresse oxidativo sexo-específico em embriões de ratas diabéticas

Gender-specific oxidative stress status in embryos from diabetic rats

Bueno A¹, Sinzato YK¹, Gallego FQ¹, Perecin F², Damasceno DC¹

¹Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Pós graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp_Univ Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP_Univ Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

***Correspondente:**

Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP. 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil
Fone/Fax: (55 14) 38801630
Email: damascenofmb@gmail.com

Este manuscrito será formatado e submetido à revista de fator de impacto relevante.

Resumo

Introdução: Embriões do sexo masculino e feminino diferem no período de pré-implantação e podem responder diferentemente em relação ao ambiente intrauterino. A literatura mostra que, em condições diabéticas, a taxa de sexo para fetos vivos pode variar, tendendo para os do sexo feminino. O objetivo desse estudo foi avaliar a condição do balanço redox em embriões machos e fêmeas (antes e depois da implantação embrionária), advindos de ratas com diferentes intensidades glicêmicas, a fim de estabelecer uma relação entre a capacidade embrionária de manter o balanço redox de acordo com o sexo e alcançar a implantação.

Material e Método: O diabetes foi induzido em ratas Sprague Dawley ao nascimento por streptozotocin (diabete moderado - DMOD) e em outro grupo de ratas na vida adulta (diabete grave - DG). Após diagnóstico de prenhez, as ratas foram mortas no dia 3 de prenhez (D3 – período pré-embrionário) ou no dia 13 de prenhez (D13 – período embrionário) para avaliação do sexo e balanço redox das mórulas e dos embriões, respectivamente.

Resultados e conclusão: As mórulas de ambos os sexos das ratas com diabete grave apresentaram alterações no balanço redox e houve maior número de fêmeas neste ambiente intrauterino hiperglicêmico antes da implantação. No entanto, após a implantação, a razão macho/fêmea para o grupo DMOD foi reduzida. Para o DG, o estresse oxidativo aumentado é independente do sexo e está presente antes e depois da implantação. Porém, a razão macho/fêmea é revertida após a implantação, tornando-se semelhante ao controle. Tendo em vista que, além dos fatores intrínsecos dos embriões na programação sexo-específica, moléculas regulatórias maternas também podem influenciar nesta programação interagindo de maneira diferenciada entre os sexos. Desta forma, a próxima etapa seria avaliar proteínas regulatórias secretadas pela mãe e sua relação com a seleção do sexo dos embriões.

Keywords: mórulas, embriões, diabete, sexo, redox.

Introdução

O metabolismo, a expressão gênica, e a taxa de crescimento durante o período de pré-implantação é sexo dependente. Embriões machos quando cultivados *in vitro* apresentaram crescimento mais rápido do que as fêmeas. Além disso, os machos apresentaram maior vulnerabilidade à agressão tóxica em comparação as fêmeas (Crespo *et al.*, 2005). Há evidências que a expressão gênica do cromossomo Y acelera o crescimento do embrião, enquanto que os genes inseridos no cromossomo X retardam o desenvolvimento (Burgoyne *et al.*, 1995). Várias hipóteses são sugeridas sobre as diferenças entre os sexos na concepção (James, 2004) ou no desenvolvimento precoce (Krackow & Burgoyne, 1998). Alguns processos podem estar relacionados ao ajuste na proporção do sexo, tal como a resposta feminina e masculina à glicose (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001) e sua capacidade de sobreviver em meios contendo diferentes concentrações de glicose (Larson *et al.*, 2001).

A regulação do metabolismo celular é relevante para o desenvolvimento embrionário inicial, e o excesso de nutrientes pode causar desbalanço na homeostase metabólica (Leese *et al.*, 2008), determinando a morte do embrião (Dumollard *et al.*, 2009), diminuição da taxa de implantação, malformações embriofetais, e consequências a longo prazo na vida adulta da prole (Wyman *et al.*, 2008). *Diabetes mellitus* está associada ao distúrbio desenvolvimento do embrionário devido aos efeitos da hiperglicemia (Doblado & Moley, 2007). Bueno *et al.* (2014), demonstraram que durante a prenhez diabética, embriões durante a pré-implantação apresentaram taxas mais elevadas de morte celular relacionadas à redução no número de células por embrião, causando menor viabilidade fetal. Isto sugere que a qualidade desses embriões ao longo prazo pode ser questionada. A etiologia das anormalidades embriofetais induzidas por hiperglicemia são investigadas, e há evidências que alterações no equilíbrio redox de células embrionárias afetam o desenvolvimento de múltiplos órgãos e sistemas, o que resulta em grande variedade de malformações congênitas (Wentzel *et al.*, 1997; Lappas *et al.*, 2011).

Espécies reativas ao oxigênio (ROS: *Reactive oxygen species*- em inglês) são capazes de se difundir através das membranas celulares e prejudicar moléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, levando à peroxidação lipídica, danos protéicos e quebra das fitas de DNA, gerando efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento do embrião (Guerin *et al.*, 2001), incluindo retardo e bloqueio no desenvolvimento embrionário, alterações no metabolismo e, possivelmente, apoptose (Noda *et al.*, 1991; Kowaltowski & Vercesi, 1999).

Desta forma, diferentes fatores e mecanismos podem estar envolvidos no desenvolvimento embrionário precoce (Fleming *et al.*, 2004). Assim, se embriões do sexo

masculino e feminino diferem no período de pré-implantação, eles podem responder diferentemente em relação ao ambiente intrauterino (Gutiérrez-Adáns *et al.*, 2006). A literatura mostra que, em condições diabéticas, a taxa de sexo para fetos vivos pode variar, tendendo para os do sexo feminino (Machado *et al.*, 2001). Cameron *et al.* (2008) verificaram que alterações glicêmicas causaram mudanças na razão entre machos e fêmeas, com maior porcentagem de filhas sendo nascidas de fêmeas com glicemia que sofreu redução de maneira experimental. Isto mostra que mudanças glicêmicas são mais preditivas que os valores glicêmicos por si só. Corroborando estes achados, um estudo de coorte humana sugere que a razão entre machos e fêmeas possa ser um indicador por categoria da glicemia materna (Erich *et al.*, 2012). Contudo, parece existir uma relação entre o metabolismo da glicose, a formação de ROS e o sexo desses embriões. Sabe-se que, no início da prenhez, quanto maior a hiperglicemia materna, maior a produção de ROS e o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo no organismo materno e, consequentemente, no embrionário (Bueno *et al.* – dados não publicados). De acordo com o modelo proposto por Peres-Crespo *et al.* (2005), a G6PD (glicose-fosfato desidrogenase) pode modular a diferença do balanço redox entre embriões do sexo masculino e feminino sob condições de estresse oxidativo. ROS ativa G6PD como parte da resposta celular contra os danos oxidativos. Outro marcador para avaliar as diferenças entre a relação de machos e fêmeas é a atividade da via da pentose fosfato (PPP), a qual é quatro vezes maior em blastocistos fêmeas do que em machos (Leese *et al.*, 2007).

De acordo com nossos achados prévios, ratas com glicemia superior a 300 mg/dL durante a prenhez apresentam alteração no seu estado redox e, ao final da prenhez, foi confirmada a redução na taxa de recém-nascidos do sexo masculino (37,89%) quando comparada à taxa de machos da prole do grupo normoglicêmico (50,83%) (dados não mostrados). Frente aos possíveis efeitos deletérios do desequilíbrio do estado redox, embriões no início do desenvolvimento apresentam sistema de defesa que auxilia a remoção de moléculas oxidadas, visando manter um desenvolvimento adequado (Bueno *et al.* – dados não publicados).

A glutatona reduzida (GSH) é um dos principais sistemas de defesa não-enzimático contra ROS embrionário (Takahashi *et al.*; 1993; Gardiner *et al.*, 1995; 1998). GSH também é o substrato da enzima glutatona peroxidase (GSH-PX), o qual é responsável pela redução de moléculas oxidadas nos blastocistos (Yoshida *et al.*, 1993).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório comprovam que embriões iniciais coletados de ratas diabéticas apresentam menores concentrações de GSH e aumento nas concentrações de H_2O_2 quando comparados à de embriões de fêmeas normoglicêmicas, tornando-os mais sensíveis aos efeitos deletérios do ambiente intrauterino alterado (Bueno *et al.* – dados não publicados). Ainda assim, a fragilidade biológica dos embriões do sexo masculino submetidos a meios diabéticos e sua relação com o balanço redox não estão totalmente claras. Então, estudar as diferenças entre embriões machos e fêmeas pode ser um avanço para pesquisas futuras, não somente para as distorções das razões entre machos e fêmeas, mas também com relação aos aspectos do desenvolvimento embrionário, reprogramação do genoma e processos genéticos e epigenéticos relacionados com o desenvolvimento precoce e embriopatias diabéticas. Sendo assim, a hipótese do presente estudo é que o diabetes materno seleciona os embriões do sexo feminino a partir da sua resistência aos danos oxidativos gerados pelo ambiente intrauterino alterado, desviando a taxa de sexo em detrimento à implantação do macho. Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a condição do balanço redox em embriões machos e fêmeas (antes e depois da implantação embrionária), advindos de ratas com diferentes intensidades glicêmicas, a fim de estabelecer uma relação entre a capacidade embrionária de manter o balanço redox de acordo com o sexo e alcançar a implantação.

Materiais e Método

Animais e Grupos Experimentais

Ratos machos e fêmeas da linhagem Sprague-Dawley (75 dias) foram obtidas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, São Paulo, Brasil) e mantidas sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), com livre acesso à água e ração. Os animais foram acasalados para obtenção de recém-nascidos utilizados no experimento.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais: Diabetes moderado, diabetes grave e seus respectivos controles.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp e o cuidado animal está de acordo com o Guia do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (processo nº: 939/2012).

Indução do Diabetes

O Diabetes grave (DG) foi induzido em ratas adultas (90 dias de vida) através de uma única dose de *Streptozotocin* (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, Millstone, USA), na dose de 50 mg/kg (0.1M Citrato de Sódio, pH 4.5). O critério de inclusão para DG foi ratas com glicemia $\geq 300\text{mg/dL}$ cinco dias após a indução (Corvino *et al.*, 2015). Para o diabetes moderado (DMod) os recém-nascidos do sexo feminino receberam STZ no dia do nascimento via subcutânea, na dose de 100mg/kg. Cinco dias depois, a glicemia foi mensurada e os animais apresentando valores glicêmicos $\geq 400\text{mg/dL}$ foram incluídos no grupo DMod (Bueno *et al.*, 2014). Os grupos controles receberam tampão citrato pela mesma via e volume similares aos seus respectivos grupos diabéticos. O critério de inclusão para esses animais foi glicemia $< 120\text{ mg/dL}$ (Sinzato *et al.*, 2012 (Figure 1).

Acasalamento e Prenhez

Todas as ratas foram submetidas ao acasalamento com machos não diabéticos por um período overnight. Na manhã seguinte, quando espermatozoides foram encontrados no esfregaço vaginal foi designado como dia zero de prenhez. Depois do acasalamento as fêmeas foram mantidas em caixas individuais e os níveis glicêmicos foram mensurados pela veia da cauda na tarde dos dias 0, 3 e 13, utilizando um glicosímetro convencional (One-Touch Ultra Glucometer Life Scan, Johnson and Johnson®).

Coleta dos pré-embriões no dia 3 de prenhez

Entre as 8:00 e as 11:00 da manhã do dia 3, as ratas prenhes foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax® - Cristalia Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil) e humanamente mortas por overdose de anestesia seguida de decapitação. O útero foi exposto e removido para a coleta das mórulas através do flushing dos cornos uterinos com 1.0 mL do meio mR1ECM-pva pré-aquecido (Cozzi *et al.*, 2010). Embriões foram removidos e o lavado do lúmen uterino foi estocado à -80°C para posterior análise da concentração de GM-CSF utilizando kit específico para ELISA (Abcam®)

Avaliação do estado redox de pré-embriões (dia 3)

Resumidamente, para a análise de H₂O₂ e GSH, os embriões foram imediatamente removidos do meio e incubados em CM-H2DCFDA (Molecular Probes - Invitrogen®) diluído em D-PBS (Invitrogen®) ou em Thiol Tracker Violet (Molecular Probes - Invitrogen®) respectivamente. Depois disso, os embriões foram lavados em gotas de D-PBS e incubados no meio mR1ECM-PVA para recuperação do metabolismo. Para as análises de fluorescência, nós utilizamos um microscópio de fluorescência com filtros específicos para CM-H2DCFDA e *Thiol Tracker Violet*, o comprimento de onda para excitação/emissão foi de 492-495/517-527nm e 404/526nm, respectivamente. As imagens foram capturadas e analisados através do *software Image J*® - NIH para obtenção da intensidade dos pixels. Como descrito previamente (Bueno & Damasceno, 2016).

Biópsia e Sexagem dos blastômeros

Depois das análises do estado redox, foi realizada uma biópsia para remoção de um único blastômero de cada mórula, para a determinação sexual cromossômica através da técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH) em célula única. Para identificação dos cromossomos Y e X de cada blastômero, foi utilizada a probe *Murine Whole Chromosome Painting Probes (CytoCell*®) seguindo a metodologia descrita por Mandavilli *et al.* (2010).

Coleta de embriões Pós-Implantação (Dia 13) e preparo das amostras

No dia 13 de prenhez, ratas dos grupos controle, diabetes moderado e diabetes grave foram anestesiadas letalmente usando tiopental sódico. O útero foi exposto e removido. Os sítios de implantação foram removidos e dissecados para coleta dos embriões.

Avaliação do Estado Redox após a implantação (D13)

Cada embrião foi homogeneizado (homogeneizador MPV 306 - Marconi®) a fresco em solução tampão PBS (0,1M, pH 7,4) gelado. Os homogenatos foram centrifugados a 13.000 x rpm por 10 minutos a 4°C para obtenção do sobrenadante que foi armazenado em freezer a -80°C até o momento dos ensaios. O sobrenadante foi usado para as determinações da atividade da GSH-Px e concentração de grupos tióis de acordo com protocolo de Sinzato *et al.* (2016 – submetido à publicação), concentração de proteínas totais pelo método de Bradford. Para as dosagens de H₂O₂. O ensaio baseia-se na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂, mediada pela horseradish peroxidase (HRP). Na presença de uma grande quantidade de H₂O₂, através da ação da HRP exógena, o vermelho de fenol muda sua coloração do vermelho para o amarelo. A adição de NaOH para a reação e eleva o pH para 12,5. A cor amarela torna-se púrpura e permanece inalterada por um longo período de tempo. Em seguida, a reação foi bloqueada pela adição de NaOH e a absorbância de 620 nm foi determinada em leitor de microplacas. Todas as medidas foram realizadas em duplicatas e os valores foram expressos em nmol de H₂O₂/mg de proteína (Moreira *et al.*, 2008).

Sexagem dos embriões (D13)

O pellet dos homogenatos foi usado para a determinação do sexo dos embriões pelo método de FISH. Uma lâmina foi preparada para cada embrião. Seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Cytocell Aquarius®), as lâminas contendo 5ul do homogenato foram imersas em 2xSSC e desidratadas em séries de etanol (70%, 85% e 100%). Cada lâmina contendo 10ul da sonda foi incubada *overnight* a 37°C. No dia seguinte as amostras foram desnaturadas por aquecimento a 75°C. 0.4xSSC (pH 7.0) e em 2xSSC, 0.05% Tween20. Uma gota de 10ul de DAPI foi utilizada para lâmina. Após de 10 minutos mantidas no escuro, as lâminas foram analisadas e as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência com câmera fotográfica acoplada.

Análise estatística

Para a análise das associações entre os grupos experimentais (intensidades glicêmicas maternas) e o sexo, foi utilizado o teste do Qui-Quadrado. A análise da diferença de proporções entre machos e fêmeas foi testada utilizando o modelo linear generalizado com distribuição binomial. As glicemias foram analisadas por distribuição Gama e as comparações dos valores médios entre as diferentes variáveis para estresse oxidativo (balanço redox) foram realizadas utilizando ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey (D3) e teste t (13).

Diabete Moderado

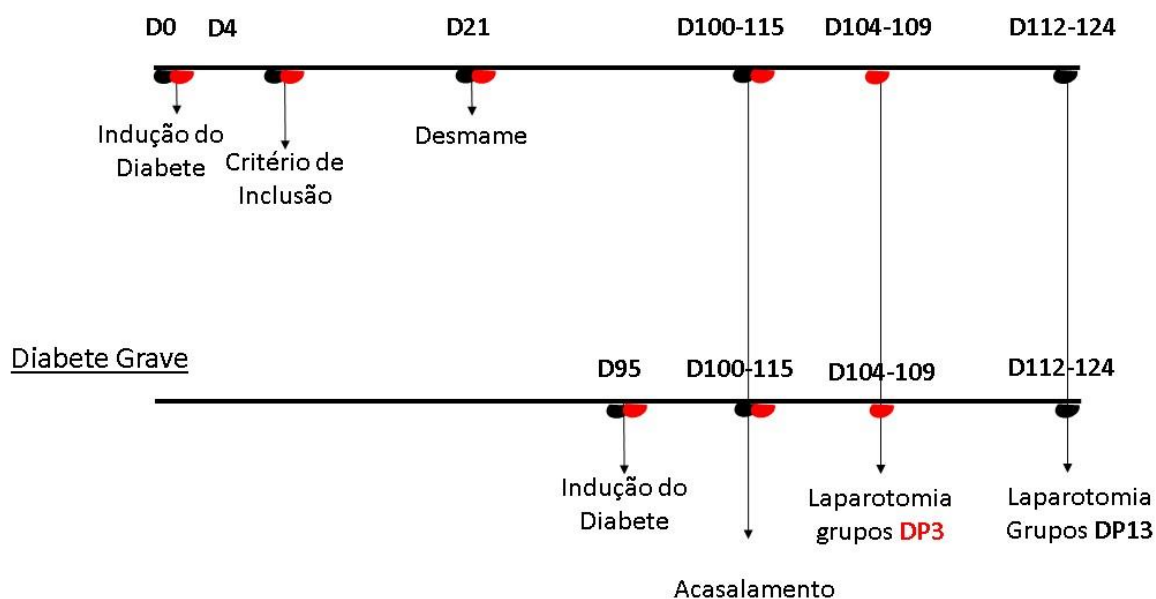


Figura 1. *Sequência experimental.* As ratas foram distribuídas em dois grupos diabéticos (DMOD e DG). Para a indução de DMOD, animais receberam STZ ao nascimento, para a composição do grupo SD os animais receberam STZ com 95 dias de vida. Cinco dias após a indução do diabete a glicemia foi mensurada como critério de inclusão. Todos os animais dos diferentes grupos foram submetidos ao acasalamento com duração máxima de 15 dias, a partir dia 100. Durante a prenhez os animais diabéticos foram aleatoriamente distribuídos em dois diferentes momentos para a laparotomia (DP3 – pré-implantação) e (DP13 – pós-implantação).

Resultados

Para avaliar o status do diabetes durante a prenhez, os níveis glicêmicos foram mensurados no dia 3 e 13 de prenhez. O grupo DMod apresentou valores glicêmicos acima de 600mg/dL sendo maior do que os valores apresentados pelo grupo controle e pelo grupo DMod (Figura 1).

Não houve associação entre a hiperglicemia e o sexo dos embriões no período de pré-implantação entre os grupos estudados (Figura 2C). Mas quando os grupos foram avaliados individualmente, o grupo DG apresenta aumento na porcentagem de embriões do sexo feminino (Figura 2A).

Os grupos controle e DMod não apresentam diferença estatisticamente significativa no conteúdo de GSH e H_2O_2 independentemente do sexo. Houve redução do conteúdo de GSH no grupo DG e aumento nas concentrações de H_2O_2 . Além disso, embriões machos do grupo DG apresentam maiores concentrações de GSH quando comparados às fêmeas do mesmo grupo (Tabela 1).

No dia 13 de desenvolvimento, da mesma forma que no dia 3, não houve associação entre a hiperglicemia e o sexo dos embriões analisados (Figura 2C).

Porém, a análise individual mostrou que embriões recuperados de ratas DMod apresentam aumento no número de fêmeas comparado ao número de machos do mesmo grupo. Porém, com 13 dias de desenvolvimento, o quadro se inverte e o número de embriões do sexo masculino é maior do que o número de embriões fêmeas (Figura 2B). Para o grupo diabetes grave, a porcentagem de machos e fêmeas com 13 dias de desenvolvimento é semelhante ao apresentado pelo grupo controle

As fêmeas recuperadas no dia 13 de ratas com diabetes moderado ou grave apresentam aumento da atividade de GSH-Px e nas concentrações de SH e H_2O_2 comparado aos machos e fêmeas do grupo controle. Além disso, os embriões machos coletados de ratas controle apresentam aumento na concentração de SH quando comparados às fêmeas do mesmo grupo (Tabela 2).

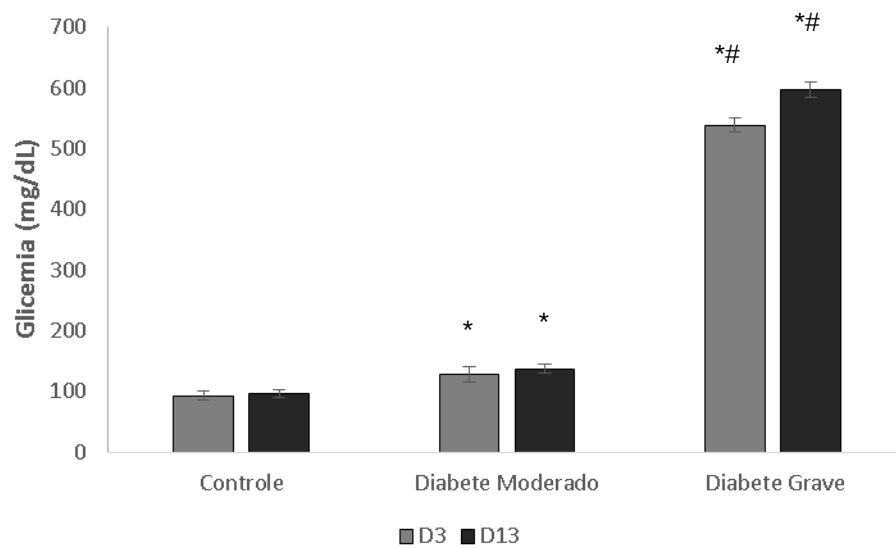


Figura 1. Níveis glicêmicos de ratas prenhez dos grupos estudados nos dias 3 e 13 de prenhez (Distribuição Gama) * $p < 0.05$ comparado ao controle; # $p < 0.05$ comparado ao diabete moderado.

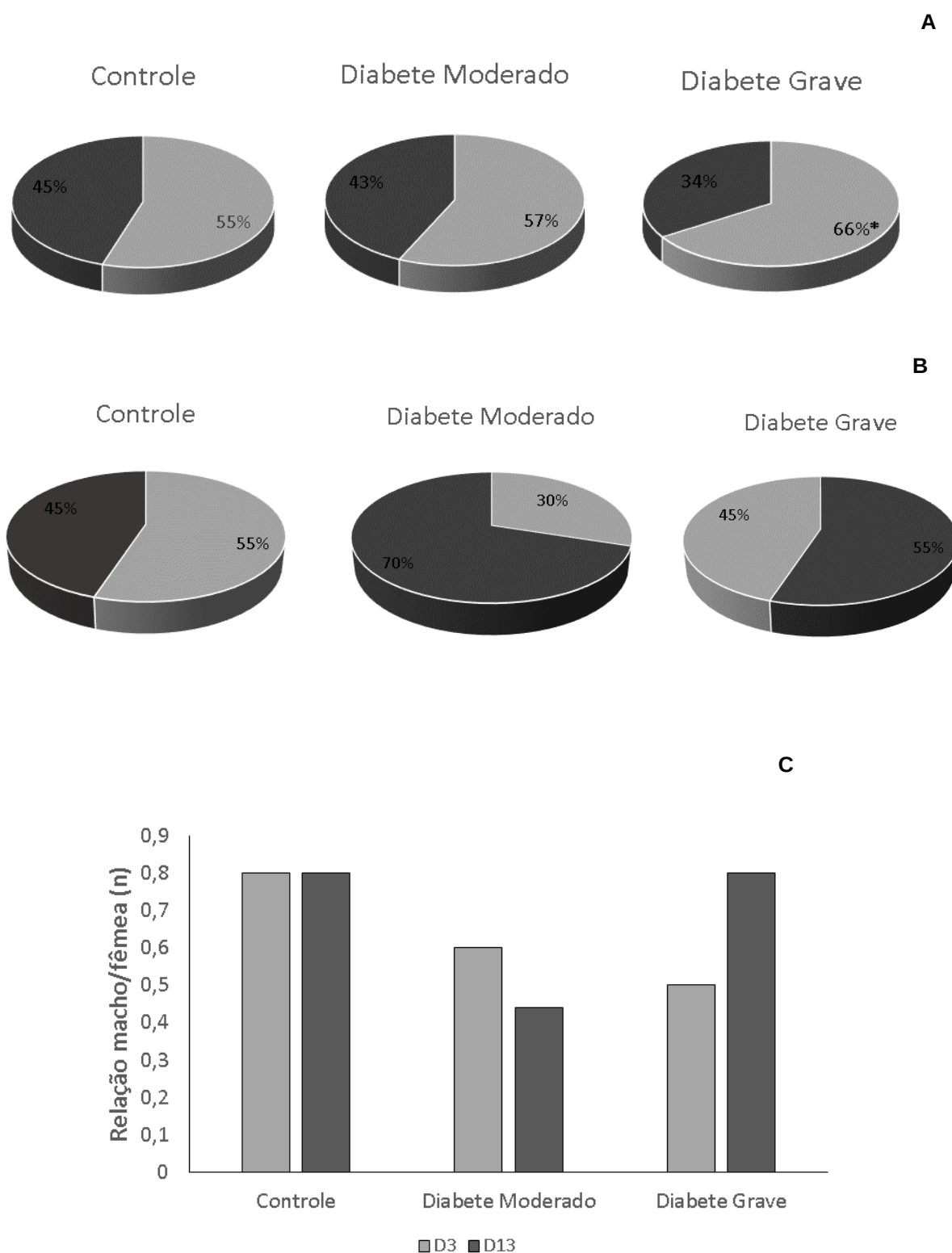


Figura 2. Porcentagem de embriões machos e fêmeas comparados dentro de cada grupo. **(A)** Embriões dos grupos Controle, Diabete Moderado e Diabete Grave no dia 3 de prenhez, * $p > 0.05$ comparado aos machos (Teste do Qui-quadrado); **(B)** Embriões dos grupos Controle, Diabete Moderado e Diabete Grave no dia 13 de prenhez; **(C)** Relação Fêmea:Macho (XX : XY) nos grupos controle, Diabete Moderado e Diabete grave no dia 3 e 13 de prenhez.

Table 2. Intensidade de fluorescência relativa de GSH e H₂O₂ em mórulas recuperadas de ratas controle, diabetes moderado e diabetes grave no dia 3 de prenhez.

Grupo	Sexo	Variável	Média	Desvio Padrão
Controle	XX	GSH	15.60 a	3.29
		H₂O₂	5.30 a	1.26
	XY	GSH	15.98 A	3.98
		H₂O₂	5.74 A	0.83
Diabete Moderado	XX	GSH	14.80 a	2.29
		H₂O₂	5.50 a	0.73
	XY	GSH	14.79 A	2.99
		H₂O₂	5.56 A	0.88
Diabete Grave	XX	GSH	7.43 b	2.58
		H₂O₂	8.12 b	0.59
	XY	GSH	9.98 B*	3.95
		H₂O₂	7.99 B	0.43

A intensidade relativa é apresentada pela razão entre a intensidade absoluta e o número de pixels por embrião de cada sexo.

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre fêmeas de diferentes grupos experimentais

Valores seguidos de letras maiúsculas diferem entre machos de diferentes grupos experimentais

*p < 0.05 – comparação entre machos e fêmeas do mesmo grupo

ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey

Tabela 3. Atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e concentrações de H₂O₂ e grupos tióis (SH) em embriões coletados de ratas controle, diabetes moderado e diabetes grave no dia 13 de prenhez.

Grupo	Sexo	Variável	Média	Desvio Padrão
Controle	XX	GSH-Px	15.51a	0.16
		SH	1.73a	2.38
		H ₂ O ₂	0.01a	0.02
	XY	GSH-Px	15.49A	0.07
		SH	6.91A*	1.10
		H ₂ O ₂	0.08A	0.06
Diabetes Moderado	XX	GSH-Px	8.17	2.87
		SH	10.17b	3.81
		H ₂ O ₂	0.69b	0.29
	XY	GSH-Px	8.12A	1.46
		SH	17.40A	0.19
		H ₂ O ₂	0.70A	0.17
Diabetes Grave	XX	GSH-Px	16.93A	4.18
		SH	22.40A	2.94
		H ₂ O ₂	0.60A	0.12
	XY	GSH-Px	16.43A	2.93
		SH	22.65A	2.38
		H ₂ O ₂	0.56A	0.10

Valores seguidos de letras minúsculas diferem entre fêmeas de diferentes grupos experimentais.

*p<0.05 – Comparação entre machos e fêmeas do mesmo grupo (T test).

nmol /min/mg proteína é expresso para a atividade de GSH-Px;

mM/mg proteína é expresso para as concentrações der SH;

nmoles/mg proteína é expresso para as concentrações de H₂O₂.

Discussão

Esse estudo foi realizado para testar a hipótese de que os embriões do sexo masculino são mais sensíveis aos danos oxidativos gerados pelo diabetes materno do que os embriões do sexo feminino, o que poderia explicar o desvio na razão de sexo encontrado na prenhez diabética visto na literatura atual (Machado et al., 2001; Erlich et al., 2012).

Dois diferentes modelos de diabetes experimental foram utilizados, sendo o grupo diabetes moderado (DMod) composto por fêmeas com intensidade glicêmica mais branda e o grupo diabetes grave (DG), composto por fêmeas com hiperglicemia descompensada seguida de poliúria, hiperfagia e polidipsia, conforme proposto pelos modelos utilizados e pela literatura (de Souza et al., 2010; Damasceno et al., 2013). No presente estudo, a alteração glicêmica materna foi confirmada no dia da morte para coleta de mórulas (D3) e de embriões (D13). É importante ressaltar que ratas com DG apresentam um estado de doença crônica que acarreta alterações no estado redox, enquanto fêmeas DMod, embora hiperglicêmicas, apresentam condições de manter seu próprio estado redox (Bueno et al. – dados não publicados), mas não estão exclusas de outras alterações metabólicas geradas pela hiperglicemia durante a prenhez.

Período de pré-implantação

Nossos resultados mostraram que não houve associação entre o sexo do embrião e a intensidade glicêmica materna no dia 3 de prenhez. Porém, quando a avaliação foi realizada considerando cada grupo experimental, as ratas com maior glicemia (grupo DG) apresentaram aumento no número de embriões do sexo feminino. Para entender o mecanismo envolvido na redução de embriões do sexo masculino apresentado pelo grupo DG, a condição do estado redox desses embriões foi avaliada usando sondas fluorescentes para a detecção de GSH e H_2O_2 . Nossas análises mostraram que, antes da implantação embrionária, embriões do grupo DG apresentaram menores concentrações de GSH e maior produção de H_2O_2 quando comparado às dos grupos controle e DMod. Porém, os embriões do sexo masculino do grupo DG apresentaram maiores concentrações de GSH do que os embriões do sexo feminino. Ainda assim, essa resposta não foi suficiente para diminuir as concentrações de H_2O_2 nesses embriões. Embora os embriões do sexo masculino apresentassem maiores concentrações de GSH, por alguma razão os embriões do sexo feminino tiveram maiores chances de sobreviver, sugerindo que o desvio na razão de sexo destes animais não está diretamente relacionado com o equilíbrio redox nos estágios iniciais do desenvolvimento. Além disso, embora o resultado apresentado pelo grupo DG pareça favorável à reprodução, estudos realizados em nosso laboratório verificaram que no 21º dia de prenhez (prenhez

a termo) as ratas com diabetes grave apresentaram redução no número de fetos vivos, aumento de mortes embrionárias, na porcentagem de perdas pós-implantação e aumento no número de fetos classificados como pequenos para a idade de prenhez, indicando a presença de restrição de crescimento (Volpato et al., 2007).

Foi verificado também que as mórulas das ratas com DMod não apresentaram diferenças sexo-específicas em relação ao equilíbrio redox em estágios iniciais do desenvolvimento, porém Bueno et al. (2014) demonstraram que os blastocistos de ratas com DMod apresentaram redução no número de blastômeros e retardo de desenvolvimento para a fase de mórula. Esses achados sugerem que a ausência de alterações no estado redox não sinaliza que os pré-embriões encontram-se isentos das perturbações hiperglicêmicas maternas.

Período de pós-implantação

Para entender se o equilíbrio redox sofre alterações em um estágio mais tardio, análises em embriões com 13 dias de desenvolvimento (D13) foram realizadas. Os animais que foram utilizados para composição do grupo DG não conseguiram manter a prenhez até o 13º dia, pois as ratas apresentaram os cornos uterinos com processo infeccioso com pontos de implantação visíveis mas os embriões não estavam desenvolvidos. Desta forma, sugerimos que o número de animais para este grupo experimental seja dobrado para que possamos obter embriões numa fase de desenvolvimento compatível às análises em questão.

Em relação aos dados obtidos do grupo DMod, os embriões não apresentaram diferenças sexo-específicas em relação ao balanço redox em estágios iniciais. Também não houve associação entre o sexo dos embriões e a intensidade glicêmica materna no dia 13 de prenhez.

De forma similar ao grupo controle, os embriões das ratas com diabetes moderado apresentaram desenvolvimento morfológico adequado após a implantação, mostrando que não houve associação entre o sexo dos embriões e os níveis glicêmicos maternos. Por outro lado, após a implantação, os embriões do grupo DMod apresentaram maiores concentrações de peróxido de hidrogênio em relação ao grupo controle. Esse evento pode estar relacionado com a inversão na relação macho/fêmea encontrada nesse grupo, no período de pós implantação comparado ao pré-implantação, visto que as maiores concentrações de peróxido e redução na atividade de GSH-Px poderiam alterar a relação macho/fêmea.

Após a implantação, os fetos do grupo DMod apresentam maiores concentrações de H_2O_2 que o grupo controle. Essa diferença não está presente no período pré-implantação. A fosforilação oxidativa aumenta durante o desenvolvimento embrionário, tornando-se essencial para seu sucesso (Gardiner & Reed, 1994). Por isso, esse aumento nas concentrações de H_2O_2 no grupo DMod após a

implantação se deve parcialmente ao aumento do metabolismo aeróbio apresentado pelo feto. Cabe ressaltar que a maquinaria mitocondrial do feto é herdada do oócito materno e pode apresentar funcionamento anormal (Xie *et al.*, 2016) com o aumento da produção de H_2O_2 em função da hiperglicemia materna. A medida que o ambiente intrauterino apresenta aumento na disponibilidade de glicose para o feto, o sinal recebido é de que a condição é favorável à prenhez, e isso aumentaria a possibilidade de filhotes do sexo masculino (Trivers-Hillard, 1973) essa teoria explicaria o resultado que mostra que 70% dos embriões com 13 dias de desenvolvimento no ambiente intrauterino alterado são machos.

Em relação às alterações sexo-específicas do balanço redox após a implantação, há um aumento da produção de H_2O_2 pelos embriões do sexo feminino. Com esse aumento, a concentração de grupos tióis (SH) também aumenta, como uma tentativa de proteção. Gutierrez *et al.* (2005) sugere que fetos do sexo feminino apresentam maior produção de NADPH do que embriões do sexo masculino. Essa característica poderia auxiliar na formação de GSH e consequentemente manter a estabilidade do equilíbrio redox dos embriões do sexo feminino. Por outro lado, em nosso estudo, o aumento de grupos tióis também não auxiliou o aumento da atividade da enzima GSH-Px. Embora a concentração de H_2O_2 tenha aumentado nos embriões do sexo feminino das ratas DMod, existe um aumento de embriões do sexo masculino neste grupo, o que invalida a ideia de que as fêmeas sejam mais resistentes do que os machos e exclui a possibilidade de que o estresse oxidativo seja sexo-dependente no diabetes moderado.

Outra curiosidade é a diferença nas concentrações de tióis entre machos e fêmeas do grupo controle. De qualquer modo, com o aumento de SH, era esperado que houvesse redução da produção de H_2O_2 ou aumento na atividade de GSH-Px, mas não houve diferença que favorecesse a nossa hipótese. Entretanto, não existem trabalhos na literatura que expliquem as possíveis razões para esta alteração até o momento.

Ainda que o número de fetos do sexo masculino no grupo DMod tenha aumentado somente após a implantação, embriões dos sexos masculino e feminino não apresentaram diferenças na sensibilidade ao aumento na produção de peróxido gerado pelo ambiente intrauterino materno, nem antes nem após a implantação embrionária. Como as ratas do grupo DMod apresentam taxas aumentadas de perdas pós-implantação embrionária (Damasceno *et al.*, 2013), esses dados sugerem que os embriões de ambos os sexos têm condições de manter o balanço redox e alcançar a implantação, mas isso não garante o seu desenvolvimento a termo. Existem muitas alterações, como o não fechamento do tubo neural (Phelan *et al.*, 1997) e o aparecimento de doenças na vida adulta a partir da programação fetal (Barker, 2007), relacionadas ao desenvolvimento fetal e pós-natal no estado diabético, que estão envolvidas com o funcionamento do sistema antioxidante.

Nossos achados, em relação ao grupo diabetes moderado, estão de acordo com a hipótese de Trivers-Hillard (1973), que prediz que a mãe com mais recursos favoreceria o nascimento de um filho do sexo masculino, porque um macho que se desenvolve com sucesso poderá transmitir sua herança genética para muitas fêmeas. Enquanto a mãe com menos recursos favoreceria o nascimento de uma filha.

Em relação ao grupo DG, embora o quadro de estresse oxidativo persista em ambos os sexos após a implantação, a relação macho/fêmea se assemelha àquela encontrada no grupo controle, sugerindo mais uma vez que o estresse oxidativo não está envolvido no desvio de sexo encontrado durante a prenhez/gravidez diabética.

Portanto, a hiperglicemia de maior intensidade causada pelo diabetes grave levou a alterações no balanço redox de pré-embriões de ambos os sexos e houve maior número de fêmeas neste ambiente intrauterino hiperglicêmico antes da implantação, porém algum mecanismo envolvido no processo de implantação é funcional a ponto de reverter essa diferença aos 13 dias de prenhez. No entanto, após a implantação, não houve alteração na razão macho/fêmea de forma hiperglicemia dependente e a alteração do balanço redox não influenciou o número de embriões masculinos e femininos. Tendo em vista que, além dos fatores intrínsecos dos embriões na programação sexo-específica, moléculas regulatórias maternas também podem influenciar nesta programação interagindo de maneira diferenciada entre os sexos. Desta forma, a próxima etapa seria avaliar proteínas regulatórias secretadas pela mãe e sua relação com a seleção do sexo dos embriões.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, estatístico do Escritório de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina_UNESP; Profa. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli e Camila Ferreira, Instituto de Biociências_UNESP, pelo protocolo das dosagens de peróxido de hidrogênio; Danilo Chaguri e Arlindo Gabriel pelos cuidados com os animais de experimentação e à FAPESP, pela bolsa e auxílio concedido (Processos: 2011/23721-0; 2012/17275-0 e 2013/16548-5).

Referências

- Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995; 311:171–4.
- Bueno A, Sinzato YK, Sudano MJ *et al.* Short and long-term repercussions of the experimental diabetes in embryofetal development. *Diabetes Metab Res Rev* 2014; 30(7):575-81.
- Burgoyne PS, Thornhill AR, Boudrean SK, Darling SM, Bishop CE, Evans EP. The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995;350:253–260
- Cameron EZ, Lemons PR, Bateman PW. Experimental alteration of litter sex ratios in a mammal. *Proc Biol Sci.* 2008; 275(1632):323-7.
- Chang Ta-Yuan; Limanek, James S Chang, Catherine CY. (1 September 1981). "A simple and efficient procedure for the rapid homogenization of cultured animal cells grown in monolayer". *Analytical Biochemistry*. 116 (2): 298–302.
- Corvino SB, Netto AO, Sinzato YK *et al.* Intrauterine growth restricted rats exercised at pregnancy: Maternal-fetal repercussions. *Reprod Sci* 2015; 22(8):991-9.
- Cozzi J, Wang E, Jacquet C *et al.* Procedures for somatic cell nuclear transfer in the rat. *Methods Mol Biol* 2010; 597:137-50.
- Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A *et al.* Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res* 2013; 473575.
- De Souza MD, Sinzato YK, Lima PH *et al.* Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod Biomed Online* 2010; 20(4):547–552.
- Doblado M, Moley KH. Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007;14(6):488–493.
- Dumollard R, Carroll J, Duchen MR, Campbell K, Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in cell & developmental biology.* 2009;20(3):346–353.
- Ehrlich SF, Eskenazi B, Hedderston MM, Ferrara A. Sex ratio variations among the offspring of women with diabetes in pregnancy. *Diabet Med.* 2012; 29:273-278.
- Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ. The embryo and its future. *Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1046-54
- Gardiner CS and Reed DJ. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 1994; 51:1307-1314.
- Gardiner CS, Reed DJ. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318(1):30-36.
- Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ *et al.* Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod* 1998; 59(2):431-436.
- Guérin P, El Mouatassim S and Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7(2):175-89.
- Gutiérrez-Adán A1, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Ramirez MA, Moreira P, Pintado B, Lonergan P, Rizos D. Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reprod Domest Anim.* 2006 Oct;41 Suppl 2:54-62.
- Gutiérrez-Adán, A., Granados, J., Pintado, B. & de la Fuente, J. 2001 Influence of glucose on the sex ratio of bovine IM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 13, 361–365

- James, W. H. 2004 Further evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels at the time of conception. *Hum. Reprod.* 19, 1250–1256
- Kalter H: Case reports of malformations associated with maternal diabetes: history and critique. *Clin Genet* 43:174–179, 1993.
- Kowaltowski AH and Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 1999; 26:463–471.
- Krackow, S. & Burgoyne, P. S. 1998 Timing of mating, developmental asynchrony and the sex ratio in mice. *Physiol. Behav.* 63, 81–84.
- Lappas M1, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Dec 15;15(12):3061–100.
- Larson, M. A., Kimura, K., Kubisch, H. M. & Roberts, R. M. 2001 Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 9677–9682.
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.* 2008;14(12):667–672.
- Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Hum Reprod* 2007; 22:3047– 3050.
- Machado AF, Zimmerman EF, Hovland DNJ et al. Diabetic embryopathy in C57BL/6J mice. Altered fetal sex ratio and impact of the splotch allele. *Diabetes* 2001; 50(5):1193–1199.
- Mandavilli BS and Janes MS. Detection of intracellular glutathione using Thiol Tracker violet stain and fluorescence microscopy. *Curr Protoc Cytom* 2010; 9:9–35.
- Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MTS et al. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanism. *Mycopathologia* 2008; 166:17–23.
- Munné S and Estop A. Superoxide anion increases after sperm storage and produces chromosome abnormalities. *Biol Reprod* 1991; 44:681–687.
- Naeve C. Congenital malformation in offspring of diabetics. *Perspect Pediatr Pathol* 8:213–222, 1984.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken RJ and Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development* 1990; 109:501–507.
- Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y et al. Involvement of superoxide radicals in the mouse 2 cell block. *Mol Reprod Dev* 1991; 28:356–360.
- Perez-Crespo M, Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R et al. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod and Dev* 2005; 72: 502–510.
- Phelan SA, Ito M and Loeken MR. Neural tube defects in embryos of diabetic mice role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes* 1997; 46(7):1189–1197.
- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1985; 1271:67–74.
- Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL et al. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res* 2012; 108:163.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S et al. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 1993; 49:228–232.
- Trivers RL, Willard D. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 1973; 179:90–92.

- Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MV, Padovani CR, Calderon IM. Effect of Bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2008; 116:196-120.
- Wentzel P, Thunberg LA and Eriksson UJ. Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia* 1997; 40:7-14.
- Wyman A, Pinto AB, Sheridan R, Moley KH. One-cell zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. *Endocrinology*.2008;149(2):466–469.
- Xie HL, Wang YB, Jiao GZ et al. Effects of glucose metabolism during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Sci Reprod* 2016; 6:20764.
- Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Reprod*

Capítulo 3

Uterine lumen granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) during the early pregnancy of diabetic rats

Running title: GM-CSF and diabetic pregnant rats

Bueno A¹, Sinzato YK¹, Rudge MVC¹, Damasceno DC^{1*}

¹Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Graduate Course on Gynecology, Obstetrics and Mastology, Botucatu Medical School, Unesp_Univ Estadual Paulista, São Paulo State, Brazil.

***Correspondence to:**

Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP. 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil
Fone/Fax: (55 14) 38801630
damascenofmb@gmail.com

Word count

Abstract: 223 words

Main Text: 1032 words

Abstract

Aim/Hypothesis: GM-CSF is secreted into the uterine lumen especially in the preimplantation period leading to the embryo development and survival, and is an essential cytokine during early pregnancy. Studies demonstrating GM-CSF uterine concentration in diabetic pregnancy are scarce. Thus, to understand whether a relationship between this cytokine and adverse effects of diabetes is existing.

Methods: GM-CSF status was evaluated in different hyperglycemic conditions in early pregnant rats. Mild and severe diabetes were induced by streptozotocin in Sprague Dawley rats. Four days after mating, pregnant females were anesthetized and decapitated for embryos, blood and uterine samples collection. Insulin and GM-CSF concentrations and embryo sex were analyzed by specific kits by ELISA and fluorescent in situ immune hybridization (FISH), respectively.

Results: GM-CSF uterine concentrations decreased as maternal hyperglycemia increased and a positive correlation with serum insulin concentration was confirmed. In addition, it has been postulated that diabetes can change the litter sex rate by impairing the male embryo to develop.

Interpretation/Conclusion: In this study, we show a positive correlation between GM-CSF uterine concentrations and male embryos at day 3 of pregnancy and interestingly, no correlation between GM-CSF and female embryos was demonstrated. Thus, a GM-CSF decrease could impair sex rate in diabetic pregnancy, and these data show GM-CSF must be better studied in diabetic pregnancy in order to elucidate mechanisms involved in their adverse outcomes.

Keywords: colony-stimulating factor, sex sensibility, diabetes, pregnancy, rats.

Introduction

During pregnancy, the maternal reproductive system undergoes modifications as abundant alterations in their endocrine system and cytokine production. The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), also known as colony stimulating factor 2, is a monomeric glycoprotein secreted by macrophages, T cells, endothelial cells and fibroblasts that functions as a cytokine. GM-CSF is secreted into the luminal compartment by the epithelial cells in the oviduct and the uterus, especially in embryo preimplantation and subsequent development and survival (Hardy & Spanos, 2002).

In rodents and in other mammals, the semen stimulates uterine epithelial cell receptors to produce GM-CSF (Robertson, 2005; Tremellen et al., 1998). GM-CSF regulates both the pre-embryo during trophoblastic invasion and the leukocytes that control maternal adaptive immune responses. During pregnancy, GM-CSF deficiency adversely impacts both fetal and placental development, progeny viability and perinatal growth, demonstrating that this cytokine is a central maternal determinant of pregnancy outcome with clinical relevance in human fertility (Robertson, 2007).

GM-CSF null mice present normal implantation rate and live fetuses are born. However, the offspring size is smaller due to fetal death. On the day 17 of pregnancy, the resorption (embryonic death) rate was increased after implantation, which was related to fetuses with abnormalities and reduced fetal weight. The mortality rate during the first three weeks of life was more evident in male pups; showing fetal growth and viability are affected by absence of maternal GM-CSF (Robertson et al., 1999). These findings are similar to those from diabetes-induced adverse effects during pregnancy (Damasceno et al., 2013). Nevertheless, studies associating GM-CSF and maternal diabetes repercussions are scarce. Thus, to understand whether a relationship between this cytokine and adverse effects of diabetes is current, GM-CSF status was evaluated in different hyperglycemic conditions in early pregnant rats.

Materials and Method

Animals and experimental groups

Sprague-Dawley rats were purchased from the State University of Campinas (UNICAMP, São Paulo, Brazil) and kept under controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and lighting (12h light/12h dark cycle), with free access to food and water. Animals were mated and the offspring were randomly distributed into three experimental groups: non-diabetic (control group); mild diabetes (diabetes induced at birth), and severe diabetes (diabetes induced at adulthood) The study was approved by the institution's Animal Research Ethics Committee and the animals were treated in accordance with the Brazilian College of Animal Experimentation Guidelines (Permit Number: 939/2012).

Diabetes induction

Severe diabetes (SD) was induced at 90 days of life by intraperitoneal injection of 50 mg/kg (0.1M sodium citrate, pH 4.5) streptozotocin (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, Millstone, USA). Mild diabetes (MD) was induced in female at birth (day 0) after subcutaneous injection of STZ (100 mg/kg). The inclusion criteria was followed according Corvino et al., (2015) and Bueno et al., (2014).

Offspring Mating and pregnancy

All adult female rats (110 days of life) from experimental groups (SD, MD, and nondiabetic controls) were mated overnight with non-diabetic males. The morning when spermatozoa were found in the vaginal smear was designated as gestational day zero (D0). During pregnancy blood glucose levels were measured from a cut tip tail in the afternoon of day 3 using a One-Touch Ultra Glucometer (Life Scan, Johnson and Johnson®).

Laparotomy and following procedures

Pregnant rats were killed by anesthesia overdose (Thiopentax® - Cristalia Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brazil) and decapited. Blood

samples were collected by the trunk for serum insulin measurement (Rat Insulin ELISA Kits, Insulin Assay_Crystal Chemicals®).

The uterine fluid were collected by flushing each uterine horn with 1.0mL of pre-warmed mR1ECM-pva (Bueno et al., 2014) for embryos recovery and sexing by *in situ* fluorescence hybridization for Y and X chromosomes identification (Cytocell® FISH probes). Then, the uterine lumen washed was stored at -80°C for GM-CSF measurement by specific kit (GM-CSF Elisa Kit - ABCAM®).

Statistical analyses

Gamma distribution was applied to non-homogeneously distributed data, such as mean glycemia and GM-CSF values. Correlations were tested using Pearson's correlation coefficient. Significance was set at $P < 0.05$.

Results and Comments

Our results showed GM-CSF concentrations in animals with STZ-induced diabetes on day 3 of pregnancy were reduced according to the hyperglycemic intensity (Figures 1 and 2), suggesting changes in GM-CSF uterine concentrations during diabetic pregnancy could impair the embryonic implantation.

It is known that preimplantation embryos in diabetic milieu presents fewer number of blastomeres, and the sex ratio of early embryos/newborns is skewed, impairing male embryos development (Cameron et al., 2008; Machado et al., 2010; Bueno et al., 2016 – unpublished data). Robertson (2007) verified embryo exposure to GM-CSF during the preimplantation period regulates fetal development in utero, as well as viability and growth trajectory after birth. Embryos cultured without GM-CSF have fewer blastomeres at implantation, develop into fetuses prone to in utero growth retardation, and give rise to progeny after birth exhibiting accelerated growth and increased central fat deposition (Robertson, 2007). These results obtained by in vitro GM-CSF regulation corroborate our in vivo data from diabetic status during pregnancy. Our findings show this cytokine concentration was changed during diabetic pregnancy and led to embryo changes, similarly to Robertson (2007).

There was a strong correlation between serum insulin and uterine GM-CSF concentrations ($r^2 = 0.708$, $p < 0.05$). In addition, there was significant correlation between GM-CSF concentrations and male embryo number ($r^2 = 0.618$, $p < 0.05$ - Figures 3A and 3B). The correlation among female embryos, placental and fetal weight and GM-CSF were also assessed but these data were not statistically significant.

Our data support Robertson et al. (1999), who proved the negative effect of reduced GM-CSF concentration in early pregnancy is more evident in male embryos. Gender ratios are distorted in litters from GM-CSF null mice with male pups most susceptible to loss, and growth impairment persists into adulthood in male but not female progeny (Robertson et al., 1999).

Thus, these findings suggest GM-CSF could be involved in diabetes-induced embryopathies and it might be a hot point in studies involving diabetes and pregnancy in order to improve translational researches and interventions on diabetes and pregnancy.

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr Jose Eduardo Corrente (Research Support Office, Botucatu Medical School, Unesp) for statistical analysis and Talísia Moretto, Arlindo Gabriel and Danilo Chaguri (Academic Support Technician, Unesp) for animal care and FAPESP for financial support (Protocol Numbers 2013/16548-5, 2012/17275-0 and 2011/23732-0).

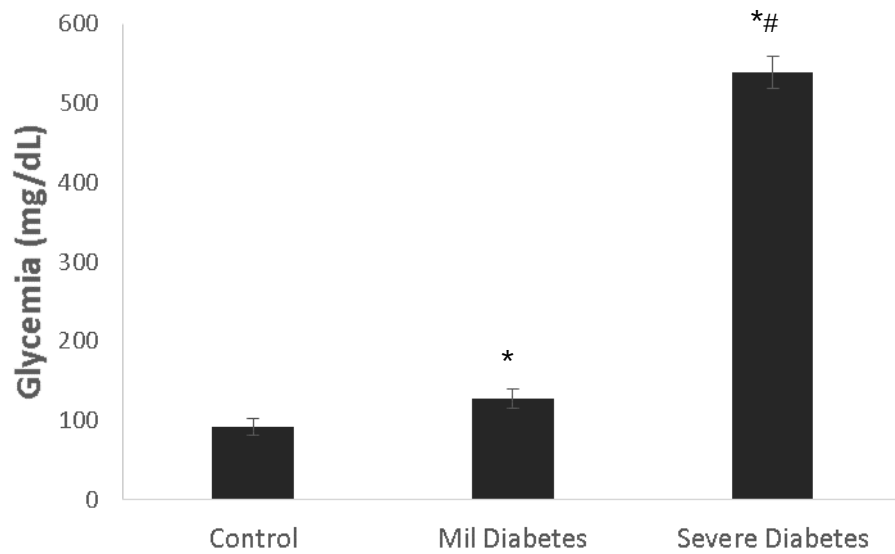


Figure 1. Blood glucose level during early pregnancy (D3 of pregnancy) of mildly (MD) and severely (SD) diabetic and control (C) groups.

Data were reported as mean $\pm$ standard deviation.

* $p < 0.05$ – compared with C group

$p < 0.05$ – compared with MD group

Gamma distribution

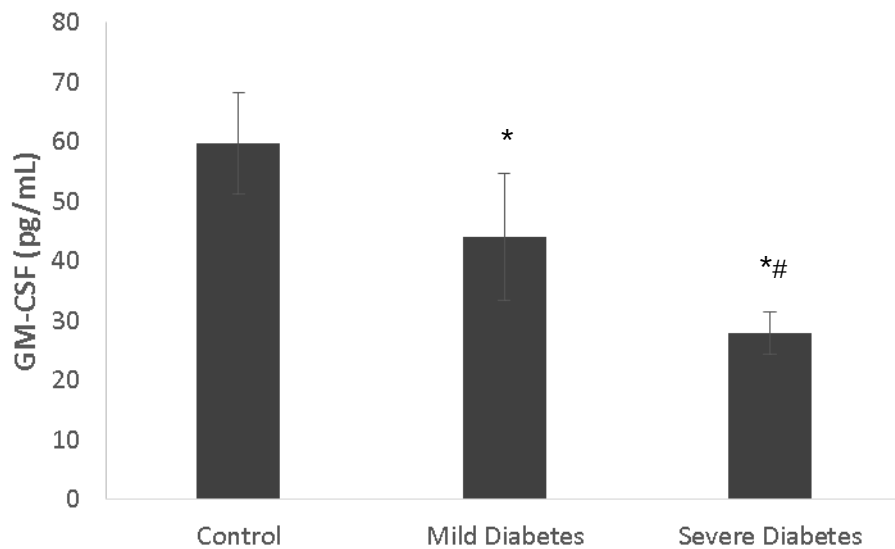


Figure 2. GM-CSF concentration in uterine lumen washing on day 3 of pregnancy from mildly (MD) and severely (SD) diabetic and control (C) groups.

Data were reported as mean $\pm$ standard deviation.

* $p < 0.05$ – compared with C group

$p < 0.05$ – compared with MD group

Gamma distribution

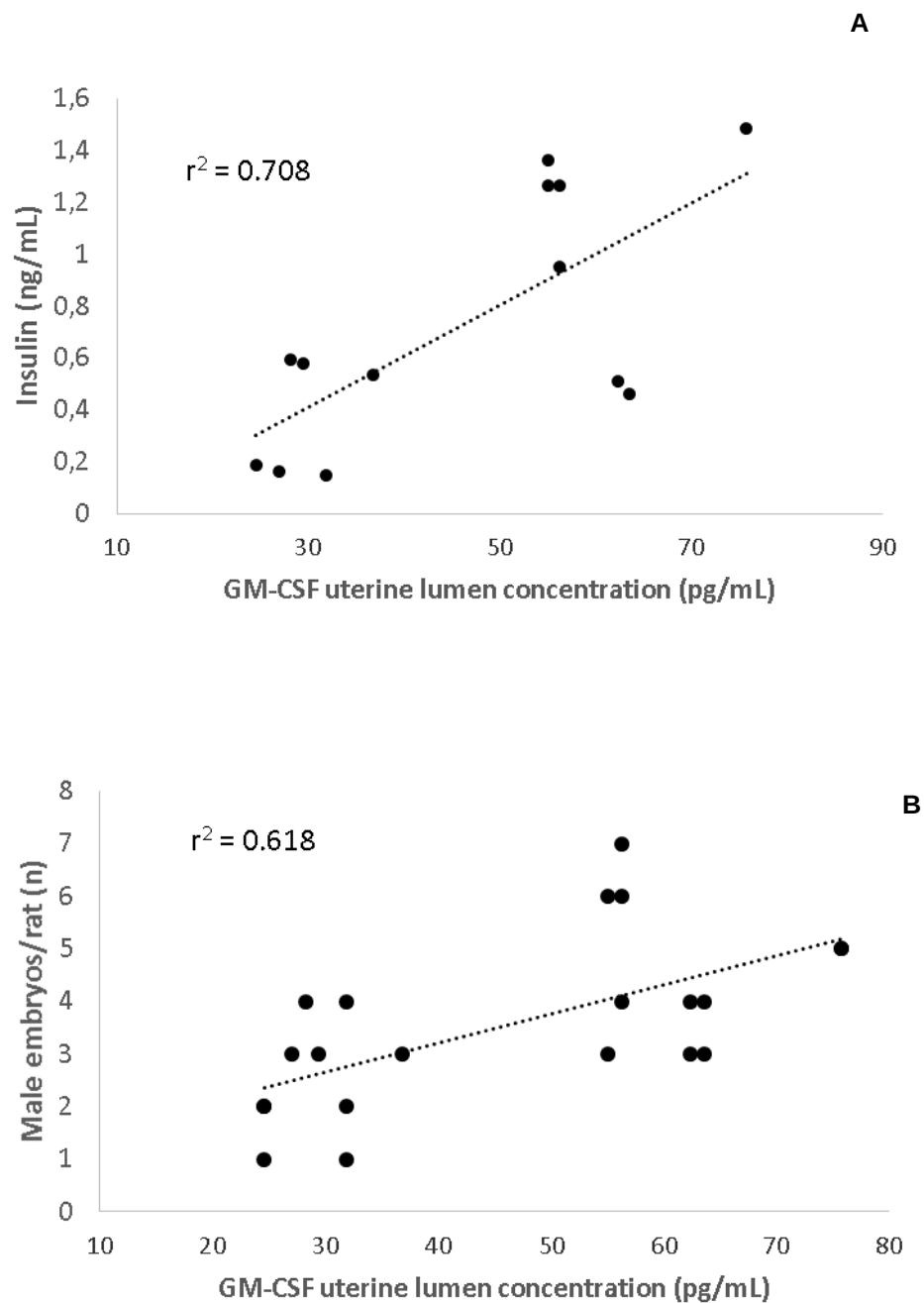


Figure 3. Relation between (A) GM-CSF and insulin concentrations. (B) GM-CSF concentration and male embryo number on day 3 of pregnancy of mildly (MD) and severely (SD) diabetic and control (C) groups. Pearson's Correlation.

References

1. Hardy K, Spanos S (2002) Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 172(2):221–236.
2. Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA (1998) Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol Reprod* 58:1217–25.
3. Robertson SA (2005) Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 322:43–52.
4. Robertson SA (2007) GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine & Growth Factor Rev* 18:287–298
5. Robertson SA, Roberts CT, Farr KL et al (1999) Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Biol Reprod* 60:251–261.
6. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A et al (2013) Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res* 473575.
7. Corvino SB, Netto AO, Sinzato YK et al (2015) Intrauterine Growth Restricted Rats Exercised at Pregnancy: Maternal-Fetal Repercussions. *Reprod Sci* 22(8):991-9.
8. Bueno A, Sinzato YK, Sudano MJ et al (2014) Short and long-term repercussions of the experimental diabetes in embryofetal development. *Diabetes Metab Res Rev* 30(7):575-581.
9. Cameron EZ, Lemons PR, Bateman PW (2008) Experimental alteration of litter sex ratios in a mammal. *Proc Biol Sci* 275:323-7.
10. Machado AF, Zimmerman EF, Hovland DNJ et al (2001) Diabetic embryopathy in C57BL/6J mice. Altered fetal sex ratio and impact of the splotch allele. *Diabetes* 50(5):1193-1199.