



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Bruna Bologna Catinelli**

**Análise Morfológica dos Músculos Reto Abdominal e Estriado  
Uretral de Ratas Prenhes Diabéticas Submetidas a Exercício em  
Ambiente Aquático**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Tocoginecologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marilza Vieira Cunha Rudge  
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Patrícia de Souza Rossignoli  
Prof(a). Dr(a). Angélica Mércia Pascon Barbosa

**Botucatu  
2020**

Bruna Bologna Catinelli

Análise Morfológica dos Músculos Reto Abdominal e Estriado Uretral  
de Ratas Prenhes Diabéticas Submetidas a Exercício em Ambiente  
Aquático

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre(a) em Tocoginecologia.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Marilza Vieira Cunha Rudge  
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Patrícia de Souza Rossignoli  
Prof(a). Dr(a). Angélica Mércia Pascon Barbosa

Botucatu  
2020

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

Catinelli, Bruna Bologna.

Análise morfológica dos músculos reto abdominal e estriado uretral de ratas prenhes diabéticas submetidas a exercício em ambiente aquático / Bruna Bologna Catinelli. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientador: Patrícia de Souza Rossignoli

Coorientador: Angélica Mércia Pascon Barbosa

Capes: 40101150

1. Diabetes gestacional. 2. Incontinência urinária.  
3. Exercícios físicos aquáticos. 4. Músculos - Doenças.

Palavras-chave: Diabetes gestacional; Exercício;  
Incontinência urinária; Miopatia.

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MÚSCULOS RETO ABDOMINAL E ESTRIADO  
URETRAL DE RATAS PRENHES DIABÉTICAS SUBMETIDAS A EXERCÍCIO EM  
AMBIENTE AQUÁTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a)  
em Tocoginecologia.

Orientadora: Prof. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientadora: Prof. Dra. Patrícia de Souza Rossignoli

Prof. Dra. Angélica Mércia Pascon Barbosa

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge  
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Fantin Domeniconi  
Instituto de Biociências – UNESP campus Botucatu

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gabriela Marini Prata  
Universidade do Sagrado Coração - USC

Botucatu, 17 de Fevereiro de 2020

# Dedicatória

O caminho para atingir mais este objetivo só foi possível pela sua força, seus conselhos, seus abraços e por acreditar em mim em momentos que nem eu acreditei que conseguiria. Você é minha inspiração como mulher, meu exemplo de força, superação, honestidade e vontade. É para você, mãe, a quem dedico esta dissertação. É impossível colocar em palavras a imensidão do meu amor por você.

# Agradecimientos

À **Deus**, por sempre me proteger e me guiar em cada passo.

À minha **família**. Minha mãe Luciana por sempre lutar para que pudesse investir em mim, me apoiar e acreditar que tudo daria certo. Minha avó Célia e meu avô Attilio, por todo o carinho, amor e cuidado para comigo. Aos meus tios, tias e primos, que são e sempre foram muito presentes em minha vida, me incentivando e acompanhando cada passo, cada conquista e compreendendo as minhas ausências. Vocês são meu porto seguro.

À **Profa. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge**, um agradecimento especial por ter acreditado na minha proposta e me proporcionar esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Serei eternamente grata pela oportunidade de trabalhar com a senhora, exemplo de dedicação, experiência e competência.

À **Profa. Dra. Patrícia de Souza Rossignoli**, minha eterna gratidão pela maneira como despertou em mim a paixão pela pesquisa e pela docência. A forma com que transmite o conhecimento é admirável, leve e revela o quanto você ama o que faz. Obrigada por me acompanhar e me ensinar tanto desde a graduação, por acreditar em mim em momentos que eu não acreditei, e por nunca ter saído do meu lado, acompanhando esta trajetória com muita dedicação, paciência e carinho, sempre lutando incansavelmente para que nossos sonhos tornassem realidade. Seus ensinamentos contribuíram muito para o meu crescimento científico e pessoal. Obrigada por ter sido além de coorientadora deste trabalho. Obrigada por ter sido meu ombro amigo nos momentos difíceis, pelos conselhos, por compartilhar suas experiências de vida e sua família comigo. Agradeço também seu marido Marcus e seu filho Felipe por momentos agradáveis de convivência.

À **Profa. Dra. Angélica Mércia Pascon Barbosa**, por ter acreditado em mim e na minha proposta e por ser fundamental para este dia chegasse. Minha eterna

admiração pela sua competência, entusiasmo e amor pelo que faz. Sua paixão pela Fisioterapia Uroginecológica é minha fonte de inspiração. Obrigada pela orientação deste trabalho, sempre com muita dedicação, objetividade, companheirismo e regada a ensinamentos.

À **Aline Medolago Carr**, minha companheira de laboratório e de casa. Muito obrigada por me ajudar tanto nessa trajetória, sem dúvidas o caminho até aqui seria mais difícil sem você ao meu lado. Obrigada por tornar os finais de semana e feriados no laboratório mais leves com o seu bom humor, companheirismo e amizade. Obrigada por ouvir minhas angústias, por sempre me apoiar e me dar forças quando tudo parecia desmoronar. Obrigada por me acompanhar em cada etapa deste trabalho e me ajudar a encontrar soluções para cada dificuldade encontrada, e por compartilhar a vida e sua família comigo.

À minha amiga-irmã **Emília**, minha eterna companheira de casa. Obrigada por ter tornado os últimos quatro anos inesquecíveis. Não tenho palavras para descrever o quanto você é especial e fundamental em minha vida. Obrigada por me ajudar a levantar e seguir em frente nos piores momentos, por celebrar cada conquista ao meu lado e por sempre me mostrar que tudo é possível quando persistimos e acreditamos nos nossos sonhos. Serei eternamente grata por nossos caminhos terem se encontrado.

À minha amiga e companheira de pós-graduação **Caroline Baldini**, um agradecimento especial por toda paciência, dedicação e por me ensinar tanto, desde a graduação. Me orgulho muito por ter a oportunidade de trabalhar e aprender com uma fisioterapeuta e pesquisadora tão competente. Sem dúvidas, você me inspira.

Aos **amigos** do Grupo de Pesquisa Diamater pelo companheirismo, ajuda e ensinamentos. Vocês foram fundamentais para meu crescimento pessoal e

profissional ao longo da pós-graduação. Quanta honra e privilégio poder trabalhar e contar com vocês.

Às minhas queridas e inseparáveis amigas **Nadine e Deborah**, que todos os dias me inspiram e me incentivam a ser uma pessoa melhor. Obrigada por permanecerem ao meu lado em cada etapa desta trajetória, celebrando cada conquista junto a mim e me confortando com suas palavras sinceras e carinhosas nos momentos ruins. Vocês são exemplo de amizade, dedicação, incentivo, afeto, coragem e resiliência. Minha eterna gratidão por ter vocês em minha vida.

Aos meus **amigos** Laís Barreto, Gabriel Oliveira, Alani Bergo, Giovanna Camilo, Gabriel Garcia e Ana Paula De Martini, que desde a graduação fazem parte dos meus dias. Obrigada por todos os momentos vividos, pelo apoio e por serem a minha família em Marília.

À minha amiga-irmã **Marina**, que há 17 anos vem me presenteando com a sua amizade. Obrigada por permanecer sempre ao meu lado, mesmo a 400 quilômetros de distância, por ser meu ombro amigo e fazer parte de todas as conquistas, incluindo esta. Não consigo imaginar minha vida sem a sua amizade. Te amo.

À **Faculdade de Filosofia e Ciências (FFC)/Unesp campus de Marília**, em especial ao **Laboratório de Ciências Fisiológicas** pela concessão das dependências para realização do trabalho.

Aos **funcionários da FFC/Unesp Marília**, em especial ao Assistente de Suporte Acadêmico, Augusto Nascimento por todo o suporte durante a coleta de materiais, padronização da imunistoquímica e por sempre nos ajudar a buscar respostas para as dúvidas que surgiram ao longo do desenvolvimento do projeto.

Ao **Laboratório de Patologia da Unidade de Pesquisa Experimental**

**(Unipex)** da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), em especial ao **Paulo Georgete** por todo o suporte desde o início da realização deste trabalho, sempre com muito bom humor.

Aos **funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação** por todo o auxílio prestado durante o período de pós-graduação.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** do Instituto de Biociências de Botucatu pelo preparo das amostras, e ao **Centro de Microscopia e Imagem** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), em especial à Flávia Sammartino Mariano Rodrigues pelo acolhimento e suporte na obtenção das imagens.

Aos **pesquisadores** do Laboratório de Matriz Extracelular pela disponibilidade, atenção e contribuições na padronização da imunistoquímica.

Ao **Laboratório de Embriologia** da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), em especial à Prof. Dra. Maria Angélica Spadella e à Rosa Maria por enriquecer este trabalho com todo o suporte nas análises e nas dúvidas que surgiram, especialmente nos últimos meses.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de Mestrado no país (Processo nº 2018/03361-8).

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Επίγρafe**

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

*Cora Coralina*

# Índice

<b>Seção 1: Contextualização</b>	
Relação entre Diabetes Mellitus Gestacional, Incontinência Urinária Específica da Gestação e Miopatia Diabética: Novas perspectivas de tratamento.....	18
Trajetória Acadêmica.....	32
<b>Seção 2: Resumo da Dissertação.....</b>	<b>38</b>
<b>Seção 3: Artigo científico: “Effect of swim exercise on the myopathy of rectus abdominis muscle of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats”</b>	
Cover letter.....	41
Abstract.....	42
Introduction.....	43
Methods.....	44
Results.....	49
Discussion.....	54
Author Contribution.....	58
References.....	59
<b>Seção 4: Artigo científico: “Effect of swim exercise on urethral striated muscle myopathy of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats”</b>	
Cover letter.....	67
Key points summary.....	68
Abstract.....	69
Introduction.....	70
Methods.....	72
Results.....	76
Discussion.....	82
References.....	85
<b>Seção 5: Dificuldades encontradas e meios para superá-las.....</b>	<b>92</b>
<b>Seção 6: Anexos</b>	
Anexo 1: Parecer de aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA).....	99
Anexo 2: Justificativa de alteração de título.....	100

# Seção 1

# Contextualização

**Relação entre Diabetes Mellitus Gestacional, Incontinência  
Urinária Específica da Gestação e Miopatia Diabética:  
Novas Perspectivas de Tratamento**

O grupo de pesquisa “Diabetes e Gravidez – Clínico e Experimental” realiza, há mais de 40 anos, pesquisas relacionadas à gestação complicada pelo diabetes, abordando desde repercussões materno-fetais até o tratamento dessa condição. O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), condição definida como intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento no segundo ou terceiro trimestre gestacional (1), está associado a complicações neonatais como macrossomia, malformações congênitas, alterações cardiorrespiratórias e síndrome de desconforto respiratório (2,3). Dentre as complicações maternas, destacam-se aumento do ganho de peso durante a gestação, alto risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 após a gravidez (4), aumento das taxas de aborto espontâneo (3), e também o aumento da incidência de incontinência urinária específica da gestação (IUEG), ou seja, a perda involuntária de urina que ocorre pela primeira vez durante a gestação (5).

A gravidez, por si só, mostrou ser fator de risco independente para o aumento da ocorrência de IUEG, com tendência a recorrer durante as gestações seguintes (5), porém o mecanismo exato pelo qual a IUEG acontece ainda não é bem elucidado. Ao associar a gravidez ao DMG, achados clínicos de Barbosa et al., 2011 mostraram que o DMG foi fator de risco independente e aumentou significativamente a ocorrência de IUEG, e esta foi fator de risco para a ocorrência de incontinência urinária (IU) 2 anos pós-parto (PP) cesárea e o DMG foi fator de risco para o desenvolvimento de disfunção muscular do assoalho pélvico (DMAP) 2 anos PP cesárea, evidenciando intrincada relação entre DMG, IUEG, e IU e DMAP 2 anos PP (6).

Está bem estabelecido que independentemente do tipo de diabetes, complicações crônicas podem se instalar, como a neuropatia, nefropatia, retinopatia

(7), além do aumento de risco para doenças cardiovasculares (8). Porém, o impacto do diabetes sobre a musculatura esquelética ainda é pouco estudado. Alterações morfológicas como perda de integridade e depósito de tecido não contrátil entre as fibras musculares (9,10), bem como alterações na sua capacidade metabólica têm sido reportadas (11,12), impactando diretamente na capacidade de geração de força pelo músculo e, conseqüentemente, na função muscular. A alteração muscular resultante do diabetes é denominada Miopatia Diabética (13,14).

O mecanismo pelo qual a hiperglicemia leva à danos musculares ainda é discutido, porém estudos em modelos animais têm demonstrado que a exposição ao diabetes resulta em falha na regeneração muscular por ineficiência das células satélite, provocando mecanismo catabólico (15). Além disso, o tempo de exposição ao diabetes, a severidade da doença, bem como as alterações bioquímicas, inflamatórias e moleculares influenciam a atividade das células satélite, impactando negativamente na sua função, e conseqüentemente, na saúde muscular geral (10).

É inquestionável a importância do músculo esquelético na manutenção do controle glicêmico, visto que é responsável pela captação de grande parte da glicose disponível. Dessa forma, a alteração na sua função pode contribuir para a progressão de complicações diabéticas adicionais (10, 16).

Considerando as alterações musculares resultantes do diabetes e os achados clínicos de Barbosa et al., 2011 (6), iniciou-se de forma translacional a etapa “bench to bedside” com estudos em modelos experimentais sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa, com o objetivo de verificar se alterações musculares já evidenciadas na clínica também estavam presentes em músculos envolvidos na continência urinária, contribuindo com o estudo do mecanismo fisiopatológico do DMG sobre a IUEG. O primeiro estudo de característica translacional foi a dissertação de

Marini que analisou morfológicamente o músculo estriado uretral de ratas prenhes com diabetes grave (glicemia acima de 300 mg/dL), sendo evidenciado adelgaçamento, atrofia, desorganização e rompimento de fibras, associado à perda da localização anatômica normal das fibras rápidas e lentas e diminuição na proporção de fibras rápidas (17). Ao analisar o músculo estriado uretral em conjunto com a Matriz Extracelular (MEC), foi demonstrado plasticidade das fibras musculares rápidas e lentas, diminuição de Keratan Sulfato e das glicosaminoglicanas totais e aumento da razão de Colágeno tipo I/ Tipo III, indicando MEC mais rígida, que pode estar relacionado a alteração no fechamento uretral (18).

Dando continuidade aos estudos experimentais acerca do impacto do diabetes na função muscular, Piculo em sua dissertação também analisou o músculo estriado uretral de ratas prenhes diabéticas, mas dessa vez, utilizando o modelo de diabetes moderado (glicemia entre 120 e 300mg/dl), demonstrando alterações similares ao diabetes grave, como atrofia, adelgaçamento, aumento de colágeno na área de músculo estriado, aumento de vasos, acúmulo de mitocôndrias, além de gotas de lipídios e grânulos de glicogênio presentes em grande quantidade, colocalização das fibras rápidas e lentas, diminuição de fibras rápidas e a presença de fibrose/deposição de fibras de colágeno, associados com atrofia muscular (19).

Os achados no músculo estriado uretral serviram de inspiração para que as investigações acerca de outros músculos envolvidos na continência urinária fossem realizadas. Vesentini em sua dissertação analisou o músculo reto abdominal de ratas prenhes com diabetes grave (glicemia acima de 300 mg/dL) e moderado (glicemia entre 120-300 mg/dl), demonstrando que em ambos os modelos experimentais de diabetes houve aumento do número de fibras de contração lenta, diminuição do número de fibras rápidas em ratas prenhes com diabetes moderado e aumento do número de

fibras rápidas em ratas prenhes com diabete grave. Ao contrário do que foi evidenciado no músculo estriado uretral, o músculo reto abdominal não apresentou diferença relacionada à área de colágeno, porém a própria adaptação da estrutura muscular observada frente à hiperglicemia pode contribuir para a disfunção muscular (20).

Com estes achados pré-clínicos retomamos de forma translacional para etapa “*bedside to bench*” em que a função dos músculos do assoalho pélvico (MAP) de gestantes com e sem DMG, foram avaliadas por eletromiografia e ultrassonografia tridimensional. Os resultados da dissertação de Baldini demonstraram pela eletromiografia que a evolução entre 24-30 e 36-40 semanas gestacionais houve diminuição do recrutamento dos músculos do assoalho pélvico no grupo DMG com diminuição da atividade em repouso ( $p=0,042$ ) e na contração tônica ( $p=0,044$ ) quando comparadas com o grupo não-DMG (21). As dissertações de Sartorão Filho e Pinheiro demonstraram pela ultrassonografia que o grupo DMG apresentou medidas biométricas diferentes em repouso ao longo da gestação, demonstrando menor adaptação ao processo fisiológico da gestação (22); e em relação a função dos MAP foi observado menor contratilidade, distensibilidade e mobilidade na análise entre 24-30 semanas de gestação e 36-40 semanas de gestação em gestantes com DMG (23).

Dessa forma, os resultados encontrados nos estudos pré-clínicos corroboram nossos resultados clínicos de que a IUEG em gestantes com DMG está associada à DMAP, estabelecendo a miopatia diabética como base fisiopatológica da disfunção muscular e IUEG no DMG.

Conforme mencionado, existem diferentes modelos experimentais de diabetes. É importante abordarmos, de maneira breve, quais são esses modelos, as drogas utilizadas e como elas agem para simular a hiperglicemia encontrada na

clínica. É importante ressaltar que os modelos experimentais contribuem para o avanço do conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos do DMG, visando o desenvolvimento de estratégias de tratamento para manter o ambiente intrauterino o mais próximo do ideal e melhorar o desenvolvimento perinatal a curto e longo prazo (24).

Para que os modelos experimentais de diabetes sejam obtidos, existem duas drogas que são mais utilizadas nos estudos: a aloxana e a streptozotocin (STZ), cujo efeito principal é a necrose das células beta pancreáticas, resultando em morte celular, e conseqüentemente, em hiperglicemia insulino-dependente. Apesar de ambas as drogas induzirem praticamente as mesmas respostas glicêmicas e insulinêmicas, o mecanismo pelo qual há necrose das células beta pancreáticas é diferente, sendo o aumento da produção das espécies reativas de oxigênio o efeito causado pela aloxana, enquanto a STZ lesa diretamente o DNA celular (25). Em decorrência dos efeitos adversos da aloxana e da pouca margem de segurança entre a dose letal e a dose eficaz para obtenção do quadro diabético, a STZ é atualmente, a droga de escolha para as pesquisas experimentais (25).

A indução do diabetes com STZ apresenta variações em relação ao tipo de animal, à dose, via e ao período de vida em que a droga é administrada, podendo gerar um quadro de diabetes grave ou diabetes moderado. Por esse motivo, é necessário a escolha de um modelo que se assemelha à hiperglicemia encontrada nos quadros de DMG. Os modelos de diabetes grave são caracterizados pela administração de STZ na vida adulta, na dose de 40-50 mg/kg de peso, via intraperitoneal ou intravenosa, resultando em hiperglicemia acima de 300 mg/dL (26). No entanto, o diabetes grave não mimetiza a condição clínica de hiperglicemia durante a gestação.

Em contrapartida, os modelos de diabetes moderado são caracterizados pela administração de STZ no período neonatal, com dose variando entre 70 mg/kg a 100 mg/kg, via intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea (27), resultando em alterações na capacidade reprodutiva (28), no desenvolvimento embrionário (29) e na matriz extracelular (19). O modelo escolhido pelo nosso grupo de pesquisa, e que vem sendo utilizado desde então é caracterizado pela administração de STZ no primeiro dia de vida, na dose de 100 mg/kg, via subcutânea, resultando em valores de glicemia acima de 300 mg/dL após 3 dias da indução, e entre 120-300 mg/dL na vida adulta (26,27). Este fato pode ser explicado pela regeneração parcial das células beta pancreáticas no decorrer da vida do animal, ou seja, as células que não foram atingidas pela STZ podem iniciar o processo de replicação, havendo a possibilidade de os níveis glicêmicos retornarem aos valores de normalidade (30). Porém, a exposição ao diabetes no período neonatal pode causar perda parcial da massa e função celular, resultando no quadro de diabetes moderado na vida adulta (31).

Dessa forma, dentre os modelos apresentados, o diabetes moderado é o que mais se assemelha à hiperglicemia observada na clínica, sendo escolhido para o estudo da fisiopatologia do diabetes durante a prenhez. Devido a possibilidade de os níveis glicêmicos retornarem aos valores de normalidade, pode haver dificuldade na obtenção deste modelo, sendo necessário o uso de grande número de animais.

Neste sentido, diante dos achados de diversos anos de pesquisa em modelos pré-clínico e clínico no rastreamento do impacto do DMG na IUEG e o estudo desse mecanismo fisiopatológico, além do estabelecimento do modelo experimental de diabetes que mimetiza a hiperglicemia encontrada em gestantes com DMG, nosso grupo de pesquisa constatou a necessidade de continuar e aprofundar as investigações, dando origem ao Projeto Temático Diamater (Processo Fapesp nº

2016/01743-5). O projeto, de característica translacional, tem como proposta comprovar se a miopatia evidenciada em ratas prenhes diabéticas também ocorre em gestantes hiperglicêmicas, e caracterizar o perfil da miopatia hiperglicêmica gestacional por meio de análises morfológicas, bioquímicas, moleculares, funcionais e ômicas. Além disso, o acompanhamento das mulheres 6-12 meses pós-parto responderá se a hiperglicemia gestacional associada à IUEG é preditora da disfunção muscular do assoalho pélvico e IU nesse período.

Em paralelo ao rastreamento da tríade constituída por hiperglicemia gestacional, IUEG e DMAP na fase clínica, o Projeto Temático Diamater também tem como proposta testar o uso do *biodevice* desenvolvido a partir de biomembrana a base de látex de seringueira como suporte para células tronco mesenquimais (CTMs) como possibilidade alternativa de regeneração muscular. Diante da limitação para pesquisas clínicas com intervenção no período gestacional, o *biodevice* tem sido testado na fase pré-clínica no pós-parto imediato de ratas prenhes com diabetes moderado, para que posteriormente possa ser utilizado em humanos.

Com o mesmo objetivo de identificar recursos terapêuticos com potencial para regeneração da musculatura lesada pela hiperglicemia, nasceu a proposta do presente estudo, que por meio de análises morfológicas, responde qual o efeito da prática de exercício aquático durante a prenhez de ratas com diabetes moderado sobre a miopatia dos músculos reto abdominal e estriado uretral.

Vale ressaltar que o exercício físico tem potencial para prevenir e tratar o DMG, visto que a prática regular promove o controle glicêmico por meio do aumento da sensibilidade à insulina, aumentando a captação de glicose pelo músculo esquelético (29-31). Diferente do que se pensava até poucos anos atrás, exercícios aeróbicos podem ser praticados de maneira segura tanto por gestantes sem DMG

quanto por gestantes com DMG (35,36), sendo exercícios em solo e aquático altamente recomendados (34,37). Tendo em vista que exercícios de alto impacto, com risco de cair e com riscos de traumas abdominais devem ser evitados, o exercício aquático se torna ideal para a gestante, além de se mostrar mais eficaz na prevenção do DMG e no controle glicêmico (33,37).

Dessa forma, a fim de se obter os benefícios resultantes da prática de exercício, é recomendado que gestantes, diabéticas ou não, se exercitem por no mínimo 30 minutos todos os dias da semana, ou na maioria deles, atingindo pelo menos 150 minutos por semana de exercício físico de intensidade moderada (33,34,38).

Embora a importância do exercício físico na prevenção do DMG seja bem estabelecida, não há consenso na literatura em relação ao protocolo de exercício que apresenta maior efetividade na prevenção, minimização ou tratamento da miopatia diabética e IUEG em gestantes com DMG, o que nos motivou a concretizar o presente estudo e iniciar as investigações acerca de um recurso terapêutico não farmacológico de importância inquestionável. Inicialmente, optamos por utilizar protocolo de exercício usualmente empregado em estudos com ratas prenhes diabéticas, porque não há respostas sobre sua eficácia para as variáveis analisadas no presente estudo.

Finalmente, sabemos que este é o início de uma longa trajetória de estudos, sempre objetivando ampliar e aprofundar o conhecimento e dispor de novos e seguros recursos para melhorar a qualidade de vida das gestantes.

## Referências

1. American Diabetes Association et al. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, v. 42, n. Supplement 1, p. S13-S28, 2019.
2. Gestantes com diabetes – orientação para pacientes (2011) Ambulatório de assistência pré-natal em diabetes. Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS.
3. Amaral CSA, Andrade PA, Dias FFP, Fortuna INR, Junior AMR, Tavares MR, Dias VF, Oliveira SBV, Capuruço BC (2012) Complicações neonatais do diabetes mellitus gestacional – DMG. *Rev Med Minas Gerais* 22 (Supl 5): S40-S42.
4. Ferrara A (2007) Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes Care* 30 Suppl 2:S141-6.
5. Hvidman L, Foldspang A, Mommsen S, Nielsen JB. Correlates of urinary incontinence in pregnancy. *International Urogynecology Journal* 2002; 13(5):278-283.
6. Barbosa AMP, Dias A, Marini G, Calderon IMP, Witkin S, Rudge MVC. Urinary incontinence and vaginal squeeze pressure two years post-cesarean delivery in primiparous women with previous gestational diabetes mellitus. *Clinics*. 2011;66(8):1341-6
7. American Diabetes Association. 11. Microvascular complications and foot care: Standards of Medical Care in Diabetesd2019. *Diabetes Care* 2019;42(Suppl. 1):S124-S138
8. American Diabetes Association. 10. Cardiovascular disease and risk management: Standards of Medical Care in Diabetesd2019. *Diabetes Care* 2019;42(Suppl. 1):S103-S123

9. Reske-Nielsen E, Harmsen A, Vorre P. Ultrastructure of muscle biopsies in recent, short-term and long-term juvenile diabetes. *Acta Neurol Scand* 1977; 55:345–362.
10. D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Frontiers in physiology* 2013; 4:379.
11. Saltin B, Houston M, Nygaard E, et al. Muscle fiber characteristics in healthy men and patients with juvenile diabetes. *Diabetes* 1979; 28:93–99.
12. Nielsen J, Mogensen M, Vind BF, Sahlin K, Højlund K, Schrøder HD, Ørtenblad N. Increased subsarcolemmal lipids in type 2 diabetes: effect of training on localization of lipids, mitochondria, and glycogen in sedentary human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; 298(3):706-713.
13. Hernández-Ochoa EO, Llanos P, Lanner JT. The Underlying Mechanisms of Diabetic Myopathy. *Journal of diabetes research*, v. 2017, 2017:3-6.
14. Monaco CMF, Perry CGR, Hawke, TJ. Diabetic myopathy: current molecular understanding of this novel neuromuscular disorder. *Current opinion in neurology*. 2017; 30(5):545-552.
15. Jeong, J., Conboy MJ., Conboy IM (2013). Pharmacological inhibition of myostatin/TGF- $\beta$  receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. *Acta. Pharmacol. Sin.* 34, 1052-1060. doi:10.1038/aps.2013.67
16. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 1981; 30(12):1000-1007.

17. Marini G, Barbosa AMP, Damasceno DC, Matheus SMM, de Aquino Castro R, Girão MJBC, Rudge MVC. Morphological changes in the fast vs slow fiber profiles of the urethras of diabetic pregnant rats. *Urogynaecologia* 2011; 25(1)e9
18. Marini G, Rinaldi JDC, Damasceno DC, Felisbino SL, Rudge MVC. Alterações da matriz extracelular causadas pelo diabetes: o impacto sobre a continência urinária. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2014; 328-333.
19. Piculo F, Marini G, Mércia A, Barbosa P. Urethral striated muscle and extracellular matrix morphological characteristics among mildly diabetic pregnant rats: translational approach. *International urogynecology journal* 2014; 25(3) 403-415.
20. Vesentini G, Marini G, Piculo F, Damasceno DC, Matheus SMM, Felisbino SL. Morphological changes in rat rectus abdominis muscle induced by diabetes and pregnancy. 2018;51:1–10.
21. Prudencio CB. Evolução dos achados eletromiográficos dos músculos do assoalho pélvico de gestantes com diabete melito gestacional. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017.
22. Sartorão Filho CI. Ultrassonografia tridimensional dos músculos do assoalho pélvico de gestantes com diabete melito gestacional. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017
23. Pinheiro FA. Ultrassonografia tridimensional da funcionalidade dos músculos do assoalho pélvico de gestantes com diabete melito gestacional. Dissertação

- (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017
24. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV et al. (2009). Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 1(1):21
  25. Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2), 216-226.
  26. Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, Rudge MVC (2014). Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed research international*.
  27. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, Piculo F (2013) Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *Journal of diabetes research*
  28. I. L. Iessi, A. Bueno, Y. K. Sinzato, K. N. Taylor, M. V. Rudge, and D. C. Damasceno, "Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: maternal and fetal repercussions," *Diabetology and Metabolic Syndrome*, vol. 2, no. 1, article 37, 2010.
  29. F. H. Saito, D. C. Damasceno, W. G. Kempinas et al., "Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development," *Diabetology and Metabolic Syndrome*, vol. 2, no. 1, article 26, 2010.
  30. Georgia S, Bhushan A.  $\beta$  cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal  $\beta$  cell mass. *The Journal of clinical investigation*, 2004. 114(7), 963-968.

31. Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano N, Fukumoto H, Seino Y. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. *Metabolism*, 1988. 37(11), 1040-1044.
32. Cordero, Y, Motolla MF, Vargas J, Blanco M, Barakat R. Exercise is associated with a reduction in gestational diabetes mellitus. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2014; 47(7):1328-1333.
33. Colberg SR, Castorino K, Jovanović L. Prescribing physical activity to prevent and manage gestational diabetes. *World journal of diabetes* 2013;4(6):256–62.
34. Di Biase N, Balducci S, Lencioni C, Bertolotto A, Tumminia A, Dodesini AR et al. Review of general suggestions on physical activity to prevent and treat gestational and pre-existing diabetes during pregnancy and in postpartum. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2018.
35. Barakat R, Perales M, Bacchi M, Coteron J, Refoyo I. A program of exercise throughout pregnancy. Is it safe to mother and newborn?. *American journal of health promotion* 2014; 29(1):2-8.
36. American College of Obstetricians and Gynecologists et al. ACOG Committee Opinion No. 650: Physical activity and exercise during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol* 2015; 126(6):135-42
37. Barakat R, Perales M, Cordero Y, Bacchi M, Motolla M. Influence of Land or Water Exercise in Pregnancy on Outcomes: A Cross-sectional Study. *Medicine and science in sports and exercise* 2017; 49(7):1397-1403.
38. American Diabetes Association 5. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*, v. 42, Supplement 1, p. S46-S60.

# Trajectoria Acadêmica

No ano de 2014 iniciei a formação acadêmica em Fisioterapia na Universidade Estadual Paulista (Unesp) campus de Marília. Foram quatro anos intensos, de muito crescimento pessoal e profissional até a conclusão do curso, no ano de 2017.

Em 2015, ainda no segundo ano da graduação me encantei pela Fisiologia do Exercício, o que me motivou iniciar projeto de pesquisa na área. Procurei a Profa. Patrícia Rossignoli, responsável pela disciplina, com a ideia de trabalhar com diabetes gestacional e exercício. Prontamente ela aceitou, me apresentou à Profa. Angélica Barbosa e iniciamos a caminhada de três anos desenvolvendo pesquisa experimental. Inicialmente não obtivemos sucesso com o modelo de indução do diabetes, e por esse motivo desenvolvemos estudos com prenhez e intervenção com exercício aquático, mas nunca deixamos de estudar e aprofundar nossos conhecimentos para que conseguíssemos trabalhar com o modelo desejado.

Em Dezembro de 2017, apresentei meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Avaliação do efeito da prática de exercício aquático sobre o estresse oxidativo em ratas prenhes”.

Ao longo desses três anos muitas pessoas me incentivaram a seguir carreira acadêmica. Tanto a Profa. Patrícia e Profa. Angélica, quanto outros professores que tiveram papel fundamental na minha formação destacaram o quanto eu tinha perfil de pesquisadora. Dividindo meu tempo entre aulas e laboratório de pesquisa, cheguei à conclusão de que meu coração batia mais forte pela área acadêmica, e no último ano da graduação já tive certeza que o Mestrado seria o próximo passo a ser dado.

Dessa forma, a Profa. Patrícia e Profa. Angélica me apresentaram à Profa.

Marilza Rudge e ao grupo de pesquisa Diamater, no qual foi possível unir as duas áreas que mais gosto: Fisiologia do Exercício e Fisioterapia em Uroginecologia e Obstetrícia, com a proposta de estudar, em modelos animais, a potencialidade do exercício aquático como recurso terapêutico não farmacológico para o tratamento da miopatia diabética.

No início de 2018, ingressei como aluna regular no Programa de Pós-Graduação, cursei disciplinas, coletei dados, me envolvi diretamente com os alunos de iniciação científica, auxiliando no delineamento de novos projetos, nas dificuldades encontradas e orientando-os na escrita quando necessário. Além disso, participei de atividades de docência no Programa de Aperfeiçoamento à Docência no Ensino Superior (PAADES), acompanhando a disciplina de Fisiologia do Exercício, e sendo a mim conferida a responsabilidade de ministrar duas aulas, cujos temas foram “Metabolismo no Exercício” e “Adaptações Neuromusculares ao Exercício”. Também participei do Estágio de Docência na disciplina de Bioquímica, ministrando os temas “Regulação do metabolismo energético” e “Estresse oxidativo”. Posso dizer que foi um dos maiores desafios enfrentados durante o Mestrado, mas transmitir o conhecimento para alunos de graduação despertou sentimentos que até então não havia vivenciado neste início de vida e experiência acadêmica.

Todas as etapas do desenvolvimento desta pesquisa trouxeram grande aprendizado, e foram fundamentais para que este momento chegasse. Esses dois anos foram intensos, com muitas responsabilidades sendo conferidas a mim, o que me levou a me dedicar ainda mais às atividades acadêmicas. Foram muitos dias, semanas e meses de dedicação exclusiva, independente de final de semana, feriado ou datas comemorativas, mas quando temos pessoas especiais ao nosso lado, estar no laboratório nessas datas se torna mais leve.

O período mais marcante no decorrer desses dois anos foram os meses de coleta de dados. Colocar em prática projeto de pesquisa com intervenção é, sem dúvida, um desafio. Utilizar um protocolo de exercício com frequência de seis dias por semana requer muita dedicação, companheirismo, trabalho em equipe e persistência. Com certeza foi o período de maior abdicção. Abdicção às vontades, aos momentos em família e amigos, aos finais de semana, feriados e férias. Mas todo o conhecimento e experiência adquiridos nesta etapa faz o esforço valer a pena.

Em paralelo a todas as atividades de laboratório, nosso grupo de pesquisa iniciou, no ano de 2018, reuniões semanais às sextas-feiras, cujo objetivo principal é analisar criticamente e discutir artigos científicos. A interação entre alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado é muito rica, agregando muito conhecimento em termos de estrutura e redação de artigos, bem como de delineamento de novos projetos e metodologia de pesquisa. Além disso, reuniões gerais são realizadas, nas quais o grupo apresenta as dificuldades encontradas, as conquistas e propostas futuras, o que nos motiva a seguir em frente e melhorar cada vez mais a qualidade de nossos trabalhos.

Em relação à produção científica, colaborei com a elaboração de trabalhos apresentados em eventos, sendo autora principal de um pôster em evento nacional no ano de 2018, autora principal de dois pôsteres no ano de 2019, sendo um deles premiado como melhor trabalho, coautora de um pôster em evento nacional, coautora de dois trabalhos selecionados para apresentação oral em eventos nacionais, e coautora de um trabalho selecionado para apresentação oral em evento internacional.

Finalizo esta etapa grata especialmente à Prof. Patrícia Rossignoli, à Prof. Angélica Barbosa e à Prof. Marilza Rudge pela confiança em meu trabalho, e ao apoio, ensinamentos e ajuda do grupo de pesquisa Diamater, que foram fundamentais para

que meu sonho se tornasse realidade. As experiências vividas me tornaram uma pesquisadora mais experiente, criteriosa, crítica, e com a certeza que, apesar de todas as dificuldades, este é o caminho que quero trilhar.

# Seção 2

# Resumo da Dissertação

Catinelli, BB. **Análise morfológica dos músculos reto abdominal e estriado uretral de ratas prenhes diabéticas submetidas a exercício em ambiente aquático.** 2020. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

**Introdução:** O Diabete *Mellitus* Gestacional (DMG) é complicação comum na gestação e trabalhos recentes têm demonstrado que independentemente do nível glicêmico, há falha na manutenção da saúde muscular denominada Miopatia Diabética. Resultados de pesquisas evidenciaram alterações morfológicas importantes no músculo reto abdominal (MRA) e estriado uretral de ratas prenhes diabéticas sedentárias. Dessa forma, é fundamental avaliar a potencialidade do programa de exercício em ambiente aquático para regeneração do MRA e do músculo estriado uretral de ratas prenhes com diabetes moderado para subsidiar a aplicação clínica em humanos. **Objetivo:** Analisar o efeito do exercício em ambiente aquático sobre o MRA e músculo estriado uretral de ratas prenhes com diabetes moderado, por análises morfológicas. **Material e Método:** No primeiro dia de vida, ratas de linhagem Wistar foram submetidas à indução do diabetes moderado por Streptozotocin (100 mg/kg, via subcutânea). Aos 90 dias de vida foi realizada medida de glicemia, considerando diabéticas as ratas que apresentaram nível glicêmico entre 120-300 mg/dL e normoglicêmicas <120 mg/dL. Iniciou-se o acasalamento, e no dia zero de prenhez as ratas foram distribuídas entre os grupos não diabético sedentário (NDS), não diabético exercitado (NDE), diabético sedentário (DS) e diabético exercitado (DE). O exercício aquático teve início no dia zero de prenhez e foi realizado durante todo o período (60 minutos/dia, 6 dias/semana). No 21º dia de prenhez, o MRA e estriado uretral foram retirados para análise morfológica (Hematoxilina-Eosina, Picrossirius Red, Tricrômico de Masson e Microscopia Eletrônica de Transmissão) e morfométrica das fibras musculares e da matriz extracelular. Foi considerado limite de significância <0.05. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que no MRA houve diminuição da área de músculo ocasionada pelo diabetes moderado ( $p < 0,01$ ), sendo que o grupo DE não apresentou aumento deste parâmetro, ou seja, o protocolo de exercício utilizado não reverteu tal alteração. A análise ultraestrutural mostrou ruptura de sarcômeros em ambos os grupos diabéticos e aumento de mitocôndrias intermiofibrilares em ambos os grupos exercitados. Em relação ao músculo estriado uretral, foi encontrado apenas diminuição da área de vasos sanguíneos nos grupos DS comparado ao NDS ( $p < 0.0001$ ), NDE comparado ao NDS ( $p < 0.0001$ ) e DE comparado ao DS e NDE ( $p < 0.0001$ ). A análise ultraestrutural mostrou áreas de ruptura de sarcômeros no grupo DS, alteração não observada no grupo DE. **Conclusão:** O diabetes moderado resultou em alterações estruturais e ultraestruturais no MRA, sendo que o protocolo de exercício não reverteu tais alterações. Apesar de não ter sido evidenciado alterações morfométricas no músculo estriado uretral, a diminuição da área de vasos sanguíneos resultante do diabetes moderado e do exercício podem causar alterações vasculares com potencial para impactar diretamente no músculo esquelético. Mais estudos precisam ser realizados para que seja desenvolvido o protocolo de exercício mais eficiente para tratamento da miopatia diabética.

# Seção 3

# Artigo científico

**“Effect of swim exercise on the myopathy of rectus abdominis muscle of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats”**

Artigo elaborado seguindo as normas da revista “Plos One” – Qualis A2 na Medicina  
 III. Fator de Impacto 2.77.

**Effect of swim exercise on the myopathy of rectus abdominis muscle of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats**

Myopathy of the pregnant rats and swim exercise

**Bruna B. Catinelli<sup>1¶‡</sup>, Patrícia S. Rossignoli<sup>2¶‡</sup>, Aline M. Carr<sup>1&</sup>, Karina S. Suyama<sup>2&</sup>, Gabriele B. Rabadan<sup>2&</sup>, Lívia M. Nascimento<sup>2&</sup>, Juliana N. Fernandes<sup>2&</sup>, Maria Angélica Spadella<sup>3&</sup>, Denise Haibara<sup>2&</sup>, Juliana F. Floriano<sup>2&</sup>, Angélica M.P. Barbosa<sup>2¶\*</sup>, Marilza V.C. Rudge<sup>1¶\*</sup>, Diamater Study Group<sup>^</sup>**

<sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physiotherapy and Occupational Therapy, School of Philosophy and Sciences, São Paulo State University (UNESP), Marília, São Paulo State, Brazil.

<sup>3</sup> Marília Medical School (FAMEMA), Marília, São Paulo State, Brazil.

**Corresponding author**

Marilza V. C. Rudge

Department of Gynecology and Obstetrics

Botucatu Medical School

E-mail: marilzarudge@gmail.com

<sup>¶</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>&</sup>These authors also contributed equally to this work

<sup>‡</sup> BBC and PSR are first authors on this work.

<sup>\*</sup> AMPB and MVCR are last authors on this work.

Membership of The Diamater Study Group is provided in the Acknowledgments.

**Funding:** This work received a scholarship from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) protocol number 2018/03361-8 to BBC. MVCR received financial assistance to develop the thematic project from Sao Paulo Research Foundation

(FAPESP) protocol number 2016/01743- 5. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## **Abstract**

*Objective:* The objective of this work was evaluate the effect of swim exercise on the myopathy of rectus abdominis muscle of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats. *Methods:* At the first day of birth Wistar newborns received Streptozotocin 100 mg/kg (diabetic group) or citrate buffer (non-diabetic group) subcutaneously. At adult life, after mating, the animals were divided in control – sedentary and exercised non-diabetic and diabetic – sedentary and exercised diabetic groups, starting the swim exercise protocol on gestational day 0 (60 minutes/day, 6 days/week). On 21<sup>st</sup> day of pregnancy rectus abdominis muscle was extracted and the sections were cut and analyzed by Hematoxylin & Eosin (H&E) and Picrossirius Red staining and Transmission Electron Microscopy to ultrastructural analysis. *Results:* Decreased muscle area and sarcomeres disruption areas were observed in diabetic – sedentary diabetic and diabetic – exercised diabetic groups. The swim exercise did not change these parameters. Also, no difference were observed in collagen area between groups. *Conclusions:* The present study demonstrated that the swim exercise protocol employed did not reverse the long-term mild diabetes-induced changes in the RAM, suggesting that different frequencies and durations of exercise should be investigated, aiming to develop the most efficient exercise protocol to treat diabetic myopathy.

## Introduction

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is a complication that affects 15-20% of pregnant women (1). GDM is glucose intolerance first diagnosed in the second or third trimester of pregnancy without previous diagnosis of Diabetes type 1 or Diabetes type 2 (1).

It has been reported that hyperglycemia can cause injuries to tissues, including failure in health and function of skeletal muscle, called diabetic myopathy (2,3). Previous clinical study reported GDM as an independent risk factor to the development of pelvic floor muscle (PFM) dysfunction 2 years after cesarean section (4).

PFM dysfunction induced by GDM can contribute to the occurrence of other maternal complications, such as Pregnancy Specific Urinary Incontinence (PSUI), once PFM are crucial to urinary continence. PSUI is characterized by the first complaint of involuntary leakage of urine during pregnancy (5).

In addition to PFM, the abdominal muscles contribute to urinary continence. The mechanism is still discussed, but the abdominal muscles are activated during PFM contraction (6-8), and the co-activation seems to contribute to the generation of a strong pelvic floor muscle contraction, resulting in increased vaginal pressure and consequently increased urethral pressure, an important mechanism to urinary continence (9,10).

Experimental study in animal models of Streptozotocin (STZ)-induced diabetes showed decreased muscle area and changes in fiber type of the rectus abdominis muscle (RAM) of diabetic pregnant rats (11), contributing to the knowledge advance about the pathophysiology of GDM on skeletal muscle health and how diabetic myopathy contributes to PSUI. Thus, structural and ultrastructural changes in

RAM may impair the strong pelvic floor muscle contraction and increase PSUI occurrence.

The literature is clear about exercise as treatment of diabetes and its complications (12-14) and the benefits of exercise practice during pregnancy on prevention of GDM and glycemic control (12, 13, 15). Different modalities of exercise are recommended during pregnancy, including land exercise, such as walking, running, dancing and water exercise, such as swimming and aquatic activities (12), but aquatic exercise showed to be more effective to prevent GDM compared to land exercise, and also presents improvement of mobility, low risk of falling and abdominal trauma (12, 16). However, the effect of swim exercise on diabetic myopathy in women with GDM is not elucidated.

In addition, experimental studies have demonstrated beneficial effects of swim exercise and resistance training on the myopathy of gastrocnemius and soleus muscles in a rat model of type 2 diabetes (17, 18), demonstrating that exercise practice can also delay or prevent diabetic myopathy. However, there are no experimental studies evaluating the effect of swim exercise on diabetic myopathy of pregnant rats.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of swim exercise on the myopathy of RAM of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats.

## **Materials and Methods**

### **Ethics Statement**

This experimental study was developed at Physiological Sciences Laboratory and the ethical permission was obtained from the Ethics Committee on

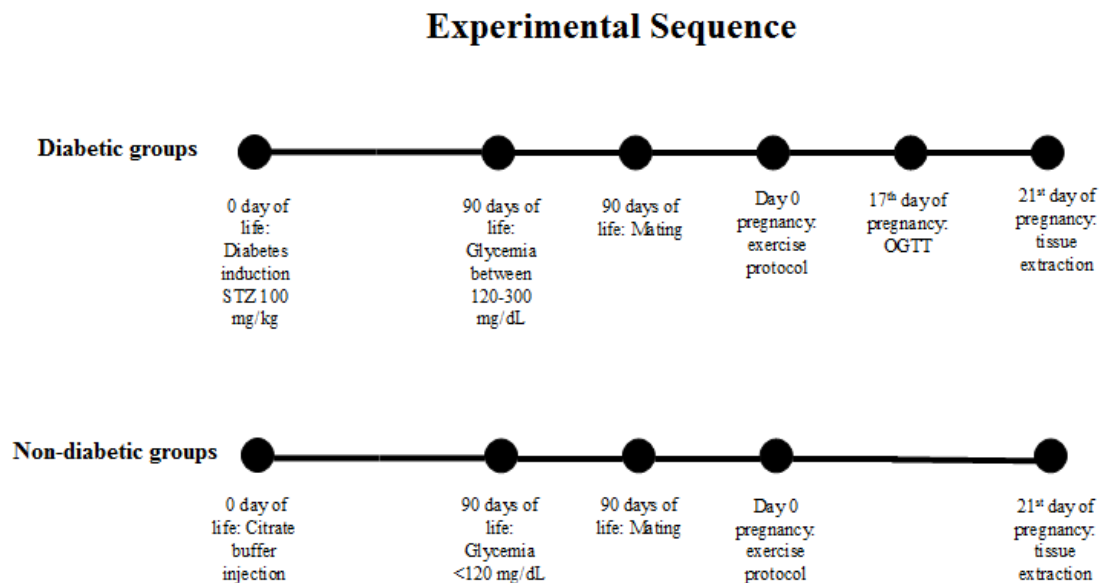
Animal Experiments n° 007/2016, both from São Paulo State University (UNESP). All surgery was performed under ketamine-xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

## Animals

Female and male Wistar rats were housed in plastic cages during all experimental protocol, maintained under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50 \pm 10\%$ ), in a 12 hour light-dark cycle, with food and water *ad libitum*.

## Experimental Sequence

The experimental sequence of the groups is shown in Figure 1.



**Fig 1:** Experimental sequence of groups.

## Experimental diabetes induction

On the first day of life, half of the female newborns received STZ (Sigma®) diluted in citrate buffer (0.1 mol/l pH 4.5) at dose of 100 mg/kg. The other half of the

females was submitted only to the administration of citrate buffer (0.1 mol/l pH 4.5) (19). All female newborn rats (NB) were maintained with their mothers until the end of the lactation period (21 days). After this period, the mother rats were killed with an excessive dose of anesthetic (Thiopentax® - 80 mg/kg).

Blood glucose level was tested in adult life, and to be included in the study, diabetic animals should present blood glucose level between 120 mg/dl and 300 mg/dl, and non-diabetic animals should present blood glucose level <120 mg/dl (20).

### **Mating**

At approximately 90 days of age, each four female rats were mated overnight with one male rat for the maximum period of 15 days. A vaginal smear was performed everyday in the morning, considering day 0 of pregnancy if spermatozoa were found (21).

### **Experimental Groups**

On gestational day 0, the pregnant rats were distributed in 4 groups: Control – Sedentary Non-Diabetic (C), Control – Exercised Non-Diabetic (Cex), Diabetic – Sedentary Diabetic (D) and Diabetic – Exercised Diabetic (Dex).

### **Swim exercise protocol**

The exercised groups (Cex and Dex) started the protocol of swim exercise on gestational day 0 until gestational day 20, at a depth of 40 cm at water temperature  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  and frequency of 6 days/week. The protocol started with 20 minutes at the first day, with progressive increases of 10 minutes/day until 60 minutes (22-24). The sedentary rats (C and D) were exposed since gestational day 0 until gestational day

20, for 15 minutes at a depth of 10 cm at water temperature  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  and frequency of 6 days/week aiming not to promote physiological adaptations from exercise practice.

### **Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)**

On the 17<sup>th</sup> day of pregnancy the females were submitted to the OGTT to confirm the glucose intolerance in diabetics (19). Before the test, the fasting blood glucose level was measured, followed by administration of an intragastric glucose solution (0.2 g/mL) at a dose of 2.0 g/kg. Blood glucose levels were measured at 10, 20, 30, 60 and 120 minutes after administration of the solution and it was considered diabetes when two or more blood glucose measurements were  $>140$  mg/dL (25).

### **Tissue extraction**

On gestational day 21 the animals were anesthetized by intramuscular ketamine-xylazine injection (10:1, 0.5 ml/300g body weight), followed by decapitation. The lower third on the right side of the rectus abdominis muscle (RAM) were obtained to morphological analysis. The fragment had approximately  $0,25\text{ cm}^2$ .

### **Morphological analysis**

The samples obtained to morphological analysis were stocked in 10% buffered formaldehyde for 24 hours, transferred to 70% alcohol and maintained at room temperature and embedded in paraffin. The fragments were sectioned in microtome (Reichert-Jung model 820) and fixed of microscope glass slides stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) and Picrossirius Red.

H&E-stained slides were used to observe the general morphology of the RA muscle. Picrossirius Red-stained slides were analyzed with the color-segmentation

method to determine the red- (collagen) and yellow (muscle fiber)-stained tissue in the same section and used to determine muscle area and collagen area. The slides were analyzed in light microscope (Olympus Corporation®/BX41TF coupled with DP25-4 digital camera. The photographs were obtained with *cell Sens* Ver 1.18 Olympus Corporation® software.

*Morphometric analysis:* To morphometric analysis of muscle area and collagen area, 40 sections each group (5 animals/group, 8 sections/animal) were selected and analyzed using CellSens Standard (Olympus Corporation®) image analysis software (20x magnification).

*Ultrastructural analysis:* The samples obtained to ultrastructural analysis (3 samples/group) were immediately fixed in Karnovsky for 3 hours at room temperature and transferred to the refrigerator to post-fixation in osmium tetroxide. Subsequently, specimens were embedded in resin to select areas of interest and perform ultra-thin cuts. The sections were obtained using an ultramicrotome at a longitudinal orientation, and stained sections were examined using transmission electron microscope (JEM 1400, JEOL®).

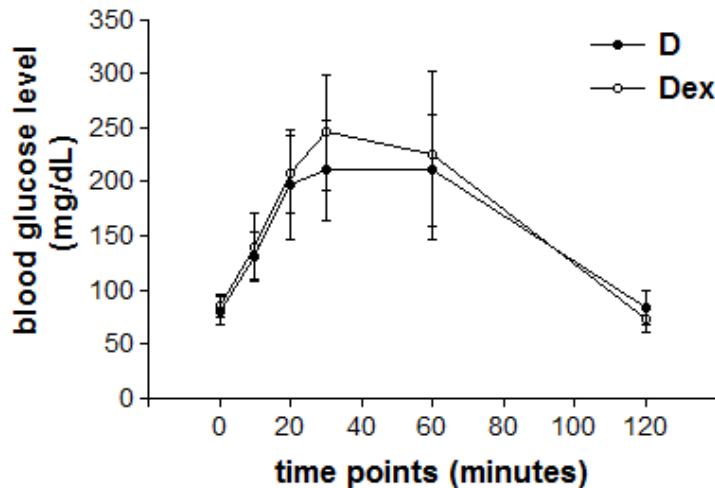
### **Statistical analysis**

The data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons of the measurements between groups were performed with Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. All analyses were performed using the GraphPad Prism® v. 8.0 software. Statistical significance was considered to be  $p < 0.05$ .

## Results

### *Maternal glycemia*

The OGTT showed that D and Dex rats had two or more blood glucose measurements >140 mg/dl. These data confirm that the induction of long-term mild diabetes was efficient, including the animals in the experimental groups. The swim exercise practice during pregnancy did not promote changes in blood glucose levels (Figure 2).



**Fig. 2.** Oral glucose tolerance test. Blood glucose level before the test and 10, 20, 30, 60 and 120 minutes after the administration of intragastric glucose solution in Diabetic – Sedentary Diabetic and Diabetic – Exercised Diabetic.

### *Control – Sedentary Non-Diabetic (C)*

In the morphometric analysis this group showed muscle area of  $302308 \pm 70427 \mu\text{m}^2$  (Figures 3A and 4A) and collagen area of  $7941 \pm 5822 \mu\text{m}^2$ . (Figures 3B and 4A). Ultrastructural analysis showed disorganized Z lines, intermyofibrillar mitochondria, organized triads and myelin figures associated with degenerated organelles. (Figures 5A and 5B).

*Control – Exercised Non-Diabetic (Cex)*

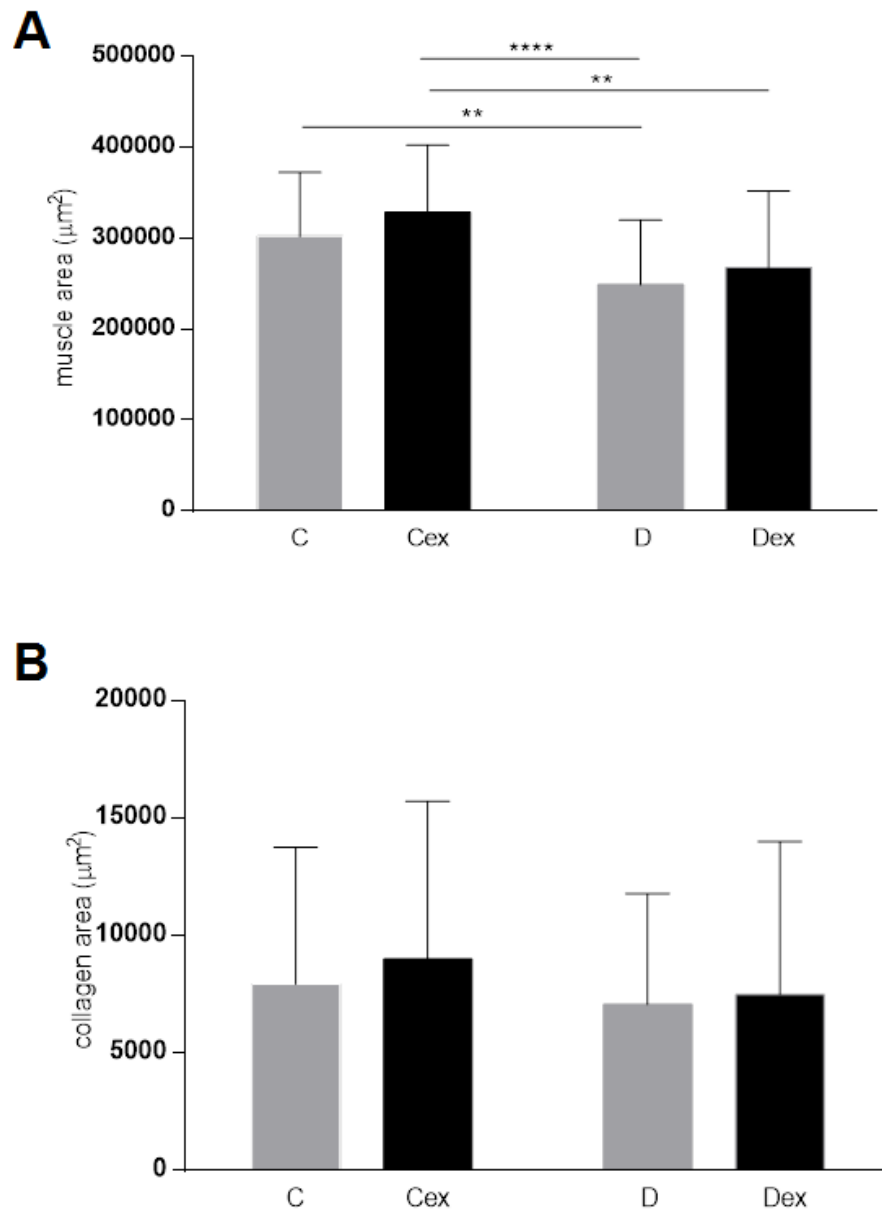
This group showed no difference in the muscle area ( $328943 \pm 73701 \mu\text{m}^2$ ) compared to the C group (Figures 3A and 4B). Also there was no difference in the collagen area ( $9008 \pm 6721 \mu\text{m}^2$ ) compared to the C, D and Dex groups (Figures 3B and 4B). Ultrastructural analysis showed sarcomeres disruption areas, intermyofibrillar mitochondria, organized triads and myelin figures associated with degenerated organelles. Disorganized Z lines were not observed. (Figures 5C and 5D).

*Diabetic – Sedentary Diabetic (D)*

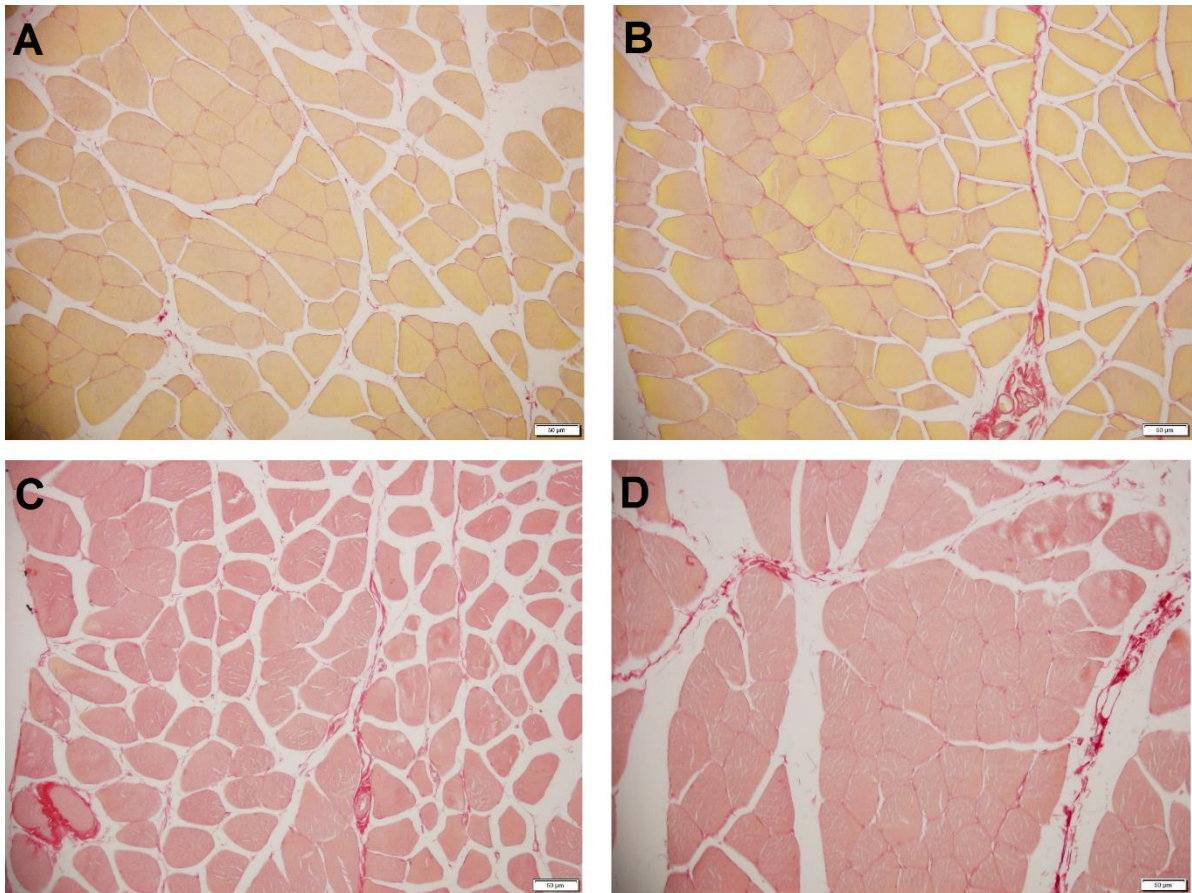
This group showed decreased muscle area ( $249018 \pm 71311 \mu\text{m}^2$ ) compared to C group ( $p < 0.01$ ) (Figures 3A and 4C). There was no difference in the collagen area ( $7082 \pm 4716 \mu\text{m}^2$ ) compared to the C, Cex and Dex groups (Figures 3B and 4C). Ultrastructural analysis showed disorganized Z lines, sarcomeres disruption areas, intermyofibrillar mitochondria, organized triads and myelin figures associated with degenerated organelles. (Figures 5E and 5F).

*Diabetic – Exercised Diabetic (Dex)*

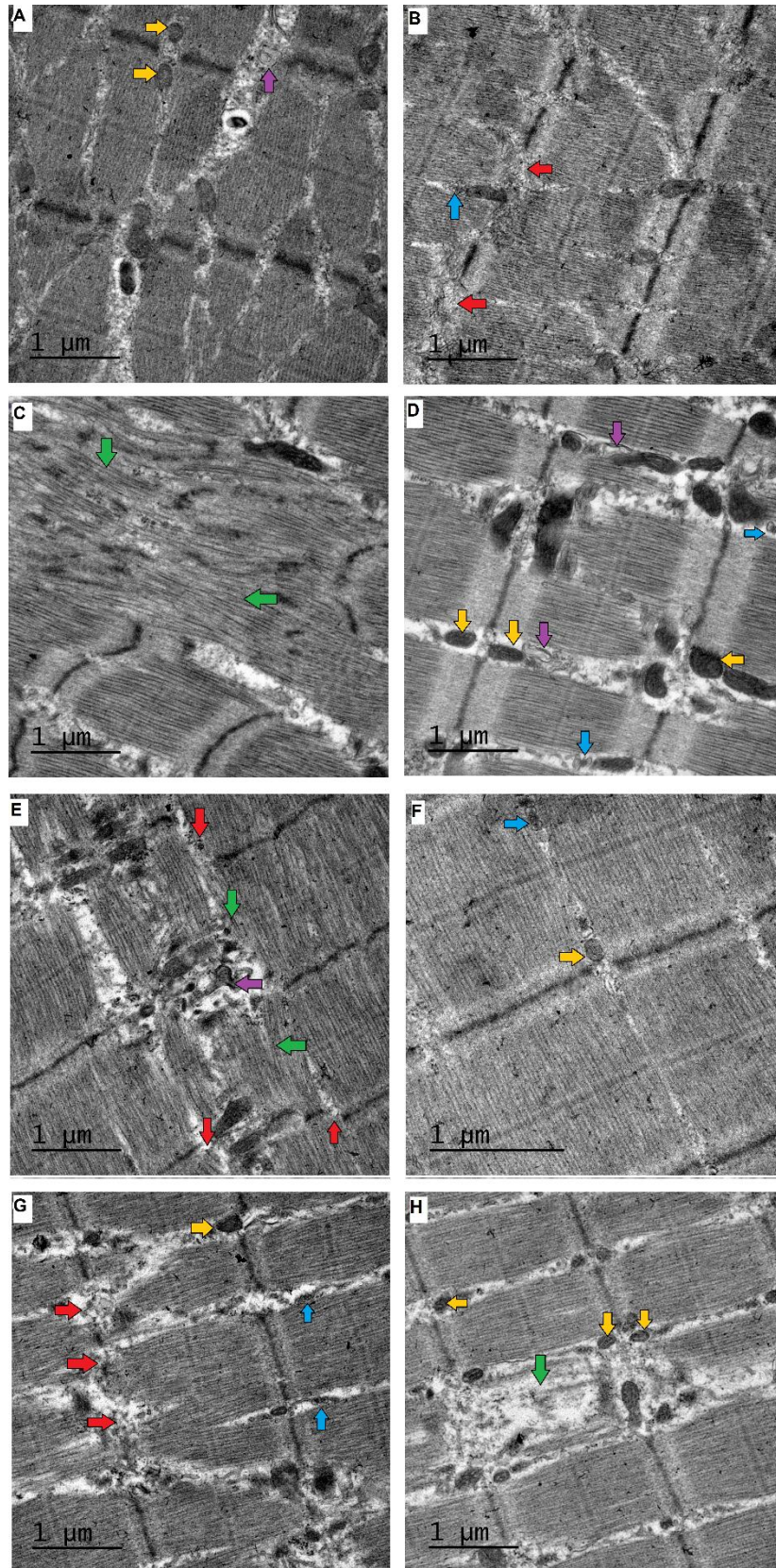
This group showed decreased muscle area ( $268118 \pm 84198 \mu\text{m}^2$ ) compared to Cex group ( $p < 0.01$ ) (Figures 3A and 4D). There was no difference in the muscle area compared to the sedentary groups (C and S). Also there was no difference in the collagen area ( $7498 \pm 6517 \mu\text{m}^2$ ) compared to Cex, C and D groups (Figures 3B and 4D). Ultrastructural analysis showed disorganized Z lines, sarcomeres disruption areas, intermyofibrillar mitochondria and organized triads (Figures 5G and 5H).



**Fig. 3:** Analysis of muscle area (A) and collagen area (B) from control – sedentary and exercised and diabetic – sedentary and exercised groups. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.



**Fig. 4:** Rectus abdominis muscle after Picrossirius Red staining of striated muscle (yellow) and collagen (red). Control – Sedentary Non-Diabetic sedentary (A), Control – Exercised Non-Diabetic (B), Diabetic – Sedentary Diabetic (C) and Diabetic – Exercised Diabetic (D). Magnification 20x. Scale bar: 50µm



**Fig. 5:** Electron micrographs of rectus abdominis muscle from control – sedentary non-diabetic (A and B), control – exercised non-diabetic (C and D), diabetic – sedentary diabetic (E and F) and diabetic – exercised diabetic (G and H). The micrographs show disorganized Z lines (red arrows), sarcomeres disruption areas (green arrows), intermyofibrillar mitochondria (yellow arrows), myelin figures (purple arrows) and organized triads (blue arrows). Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

The effect of diabetes on skeletal muscle structure and function is well established (2, 3), which turns relevant the development of therapeutic strategies to minimize the deleterious effect of diabetes. The present study is the first investigation about the effect of swim exercise on diabetic myopathy of RAM in pregnant rats.

Our data demonstrated that long-term mild diabetes induced decrease in the muscle area in the RAM of pregnant rats. Also, our data showed no difference in this parameter of both control groups (sedentary and exercised non-diabetic), which confirms that diabetes alone was responsible to decrease the muscle area. Many clinical and experimental studies have associated both type 1 and type 2 diabetes to muscle structural changes, including reduction in myofiber and myofibrillar diameter, reduced muscle mass (3, 26), reduced muscle fiber size (27) and decreased capacity for repair from damage (26). These structural alterations are related to functional changes as well, such as decline in muscle strength and increased fatigability, which contributes to decreased physical work capacity (3, 27).

However, there are few studies that evaluate the impact of GDM on the structure of muscles involved in urinary continence. The effect of long-term mild diabetes and short-term severe diabetes were evaluated in the RAM (11) and in the urethral striated muscle (28, 29) of pregnant rats, and structural changes including reduced muscle area were observed in those studies. The structural damage to these muscles may impair their function, and consequently contribute to the increased incidence of PSUI.

Our hypothesis was that the swim exercise during pregnancy would be capable of improve long-term mild diabetes induced changes in striated muscle, but our data showed no difference in the muscle area between diabetic exercised and

diabetic sedentary groups. Also, sarcomeres disruption areas were observed in both diabetic groups, which reinforces the deleterious effect of diabetes and confirms that the protocol of swim exercise used in the present study did not reverse these alterations in the RAM.

In contrast to our findings, studies have shown beneficial effects of exercise on diabetic myopathy. Alaca et al. demonstrated that different swimming exercise modalities improved the proinflammatory and pro-oxidant effects, and increased the diameter of both slow-twitch and fast-twitch fibers on gastrocnemius and soleus muscles in animal model of type 2 diabetes (17). In addition, a resistance training protocol which consisted of climbing a ladder with progressive loads enhanced muscle strength on extensor digitorum longus muscle, gastrocnemius and soleus muscles of male rats with STZ-induced diabetes, which was responsible to improve muscle physical and motor function in diabetic animals, minimizing the deleterious effect of diabetes on muscles (18). The different types and frequencies of exercise, as well as muscles analyzed may contribute to the discrepancy of findings.

In models of muscle injury or damage, as well as diabetes (30), there is accumulation of extracellular matrix (ECM), including collagen. The ECM is important to skeletal muscle integrity and provide support, contributing to skeletal muscle function (31). Despite the important function of ECM on skeletal muscle, the chronic increase of ECM can cause muscle fibrosis, characterized by increased fiber size variability and increased amount of collagen in the tissue, which impairs muscle function (32). Exercise practice seems to remodelate ECM depending on the mechanical loading to the skeletal muscle (33). Experimental study showed that a protocol of moderate exercise on a treadmill for 12 weeks (40 minutes/day, 5 days/week) was responsible to decrease collagen deposition in skeletal muscle of rats

submitted to high fat diet (34). However, a protocol of acute exercise composed by a single bout of 5-minutes running separated by 2-minutes rest on a treadmill for 130 minutes (35), as well as high-force eccentric exercise contractions (36) showed increased collagen deposition during days after the exercise session. The present study showed no difference in the collagen area, which means that neither moderate diabetes nor aquatic exercise resulted in muscle fibrosis. Similar findings were reported in previous study (11). Also, it is possible to suggest that the exercise protocol employed in the present study is not extenuating, once it does not cause changes in collagen deposition.

Although the swim exercise protocol used in the present study has not reversed long-term mild diabetes-induced changes in RAM, it is well established in the literature to diabetic pregnant rats (22, 37, 38). However, there is limitation regarding frequency and duration of the exercise sessions, because they do not entirely represent clinical conditions. The guidelines recommend that pregnant women should exercise at least 150 minutes/week or 30 minutes/day most days of week (12, 13, 39). Thus, different frequencies and duration of the exercise sessions should be explored with the aim of develop an efficient swim exercise protocol to treat diabetic myopathy in pregnant rats, and in the future, be appropriate to diabetic pregnant women as well. In addition, moderate diabetes induction occurred before pregnancy in contrast with GDM, that is developed during pregnancy, which means that future studies should consider develop a model of induction that mimics GDM not only in blood glucose levels, but also the time of exposure to hyperglycemia.

In conclusion, our findings demonstrated that the swim exercise protocol employed did not reverse the long-term mild diabetes-induced changes in the RAM, suggesting that further investigations should be made, aiming to find the most efficient

exercise protocol to treat diabetic myopathy.

### **Aknowledgments**

The authors would like to thank the staff from the Physiological Sciences Laboratory, specially A. Nascimento (Unesp, campus of Marília) and P. Georgete from Pathology Laboratory (Unesp, campus of Botucatu). Transmission electron microscopy images were obtained at the Centre of Microscopy and Image (CMI), Piracicaba Dental School, UNICAMP and the technical support of Flavia Sammartino Mariano Rodrigues is appreciated. The study was financially supported by fellowship grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/03361-8). Diamater Study Group: Rudge MVC, Barbosa, AMP, Caldeiron IMP, Souza FP, Hijas A, Sobrevia L, Palma MS, Graeff CFO, Arni RK, Herculano RD, Salvadori DF, Mateus S, Dal Pai Silva M, Magalhães CG, Costa RA, Lima SAM, Emanuelli C, Felisbino S, Barbosa W, Atallah A, Girão MJB, Di Bella Z, Uchoa SM, Payão S, Berghman B, De Bie R, Junginger B, Alves FCB, Rossignoli PS, Abbade J, Prudencio CB, Orlandi MIG, Gonçalves MI, Nunes SK, Catinelli BB, Quiroz S, Sarmiento BV, Pinheiro FA, Sartorão CI, Quiroz SBCV, Reyes DRA, Enriquez EMA, Oliveira RG, Floriano JF, Marcondes JPC, Sarmiento, Costa SMB, Dangiό TD, Pascon T, Hallur LSR, Melo JVF, Takano L, Reis FVDS, Caldeirão TD, Carr AM, Garcia GA, Rabadan GB, Bassin HCM, Suyama KS, Damasceno LN, Takemoto MLS, Menezes MD, Bussaneli DG, Nogueira, VKC, Lima PR, Lourenço IO, Marostica de Sá J, Megid RA, Caruso IP, Rasmussen LT, Prata GM, Piculo F, Vesentini G, Arantes MA, Ferraz GAR, Camargo LP, Kron MR, Corrente JE, Nunes HRC.

**Author contribution**

**Conceptualization:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Juliana F. Floriano, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Data curation:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Maria A. Spadella, Marilza V. C. Rudge.

**Formal analysis:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Marilza V. C. Rudge.

**Funding acquisition:** Bruna B. Catinelli, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Investigation:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Aline M. Carr, Karina S. Suyama, Lívia M. Nascimento, Gabriele B. Rabadan, Juliana N. Fernandes.

**Methodology:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Project administration:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Aline M. Carr, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Resources:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Maria A. Spadella, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Software:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Maria A. Spadella, Marilza V. C. Rudge.

**Supervision:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Aline M. Carr, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Validation:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Maria A. Spadella, Denise Haibara, Marilza V. C. Rudge.

**Visualization:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Writing – original draft and preparation:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

**Writing – review and editing:** Bruna B. Catinelli, Patrícia S. Rossignoli, Angélica M. P. Barbosa, Marilza V. C. Rudge.

## References

1. American Diabetes Association et al. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, v. 42, n. Supplement 1, p. S13-S28, 2019.
2. Hernández-Ochoa EO, Llanos P, Lanner JT. The Underlying Mechanisms of Diabetic Myopathy. *Journal of diabetes research*, v. 2017, 2017:3-6.
3. Monaco CMF, Perry CGR, Hawke, TJ. Diabetic myopathy: current molecular understanding of this novel neuromuscular disorder. *Current opinion in neurology*. 2017; 30(5):545-552.
4. Barbosa AMP, Dias A, Marini G, Calderon IMP, Witkin S, Rudge MVC. Urinary incontinence and vaginal squeeze pressure two years post-cesarean delivery in primiparous women with previous gestational diabetes mellitus. *Clinics*. 2011;66(8):1341–6.
5. Hvidman L, Foldspang A, Mommsen S, Nielsen JB. Correlates of urinary incontinence in pregnancy. *International Urogynecology Journal* 2002; 13(5):278-283.
6. Bø K, Mørkved S, Frawley H, Sherburn M. Evidence for benefit of transversus abdominis training alone or in combination with pelvic floor muscle training to treat female urinary incontinence: a systematic review. *Neurourology and Urodynamics: Official Journal of the International Continence Society*. 2009, 28(5), 368-373.

7. Arab AM, Chehrerazi M. (2011). The response of the abdominal muscles to pelvic floor muscle contraction in women with and without stress urinary incontinence using ultrasound imaging. *Neurourology and urodynamics*. 2011, 30(1), 117-120.
8. Ptaszkowski K, Paprocka-Borowicz M, Słupska L, Bartnicki J, Dymarek R, Rosińczuk J, ... Zdrojowy R. Assessment of bioelectrical activity of synergistic muscles during pelvic floor muscles activation in postmenopausal women with and without stress urinary incontinence: a preliminary observational study. *Clinical interventions in aging*. 2015, 10, 1521.
9. Neumann P, Gill V. Pelvic floor and abdominal muscle interaction: EMG activity and intra-abdominal pressure. *International Urogynecology Journal*. 2002, 13(2), 125-132.
10. Madill SJ, McLean L. Relationship between abdominal and pelvic floor muscle activation and intravaginal pressure during pelvic floor muscle contractions in healthy continent women. *Neurourology and Urodynamics: Official Journal of the International Continence Society*. 2006, 25(7), 722-730.
11. Vesentini G, Marini G, Piculo F, Damasceno DC, Matheus SMM, Felisbino SL. Morphological changes in rat rectus abdominis muscle induced by diabetes and pregnancy. 2018;51:1–10.
12. Colberg SR, Castorino K, Jovanović L. Prescribing physical activity to prevent and manage gestational diabetes. *World journal of diabetes* 2013;4(6):256–62.
13. Di Biase N, Balducci S, Lencioni C, Bertolotto A, Tumminia A, Dodesini AR et al. Review of general suggestions on physical activity to prevent and treat gestational and pre-existing diabetes during pregnancy and in postpartum. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2018

14. American Diabetes Association 5. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*, v. 42, Supplement 1, p. S46-S60.
15. Cordero, Y, Motolla MF, Vargas J, Blanco M, Barakat R. Exercise is associated with a reduction in gestational diabetes mellitus. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2014; 47(7):1328-1333.
16. Barakat R, Perales M, Cordero Y, Bacchi M, Motolla M. Influence of Land or Water Exercise in Pregnancy on Outcomes: A Cross-sectional Study. *Medicine and science in sports and exercise* 2017; 49(7):1397-1403
17. Alaca N, Uslu S, Gulec Suyen G, Ince U, Serteser M, Kurtel H. Effects of different aerobic exercise frequencies on streptozotocin–nicotinamide-induced type 2 diabetic rats: Continuous versus short bouts and weekend warrior exercises. *Journal of diabetes* 2018; 10(1):73-84.
18. Martins CEC, Lima VBDS, Schoenfeld BJ, Tirapegui J. Effects of leucine supplementation and resistance training on myopathy of diabetic rats. *Physiological reports* 2017; 5(10):e13273.
19. Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, Rudge MVC. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumornecrosis factor- $\alpha$  as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44(3):206-211. Y.K.
20. Iessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr* 2010; 2:37.

21. Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consoni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR. Anomalias congênitas: estudos experimentais. 1 ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008
22. Volpato GT, Damasceno DC, Kempinas WG, Rudge MVC, Calderon IM. Effect of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reproductive biomedicine online* 2009; 19(6):852-858.
23. Marangon L, Gobatto C, de Mello M, Kokubun E. Utilization Of An Hyperbolic Model For The Determination Of The Critical Load In Swimming Rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2002; 34(5):149.
24. Manchado FDB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MARD. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2006; 259-262.
25. Nascimento LLS. Avaliação de diferentes modelos de indução do diabete moderado em ratas Wistar e suas repercussões no organismo materno-fetal. Instituto de Biociências Campus de Botucatu 2014.
26. D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Frontiers in physiology* 2013; 4:379.
27. Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ (2011). Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric diabetes* 2011; 12(4):345-364.
28. Piculo F, Marini G, Barbosa AMP, Damasceno DC, Matheus SMM, Felisbino SL, Rudge MVC. Urethral striated muscle and extracellular matrix morphological characteristics among mildly diabetic pregnant rats: translational approach. *International urogynecology journal* 2014; 25(3):403-415.

29. Marini G, Piculo F, Vesentini G, Barbosa AMP, Damasceno DC, Matheus SMM, Rudge, MVC. Effects of short-term severe and long-term mild STZ-induced diabetes in urethral tissue of female rats. *Neurourology and urodynamics* 2017; 36(3):574-579.
30. Berria R, Wang L, Richardson DK, Finlayson J, Belfort R, Pratipanawatr T, Mandarino LJ. Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006; 290(3):E560-E565.
31. Ahmad K, Lee E, Moon J, Park SY, Choi I. Multifaceted Interweaving Between Extracellular Matrix, Insulin Resistance, and Skeletal Muscle. *Cells* 2018; 7(10):148.
32. Lieber RL, Ward SR. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2013; 305(3):C241-C252.
33. Martinez-Huenchullan S, McLennan SV, Verhoeven A, Twigg SM, Tam CS. The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. *Obesity Reviews* 2017; 18(7):776-790.
34. Pincu Y, Linden MA, Zou K, Baynard T, Boppart MD. The effects of high fat diet and moderate exercise on TGF $\beta$ 1 and collagen deposition in mouse skeletal muscle. *Cytokine* 2015; 73(1):23-29.
35. Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM et al. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280:R1292–R1300

36. Mackey AL, Donnelly AE, Turpeenniemi-Hujanen T, Roper HP. Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. *J Appl Physiol* (1985) 2004; 97:197–203.
37. Damasceno DC, Silva HP, Vaz GF, Vasques-Silva FA, Calderon IMP, Rudge MVC, Volpato GT. Diabetic rats exercised prior to and during pregnancy: maternal reproductive outcome, biochemical profile, and frequency of fetal anomalies. *Reproductive Sciences* 2013; 20(7):730-738.
38. Volpato GT, Damasceno DC, Sinzato YK, Ribeiro VM, Rudge MVC, Calderon IMP. Oxidative stress status and placental implications in diabetic rats undergoing swimming exercise after embryonic implantation. *Reproductive Sciences* 2015; 22(5):602-608.
39. American Diabetes Association 5. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*, v. 42, Supplement 1, p. S46-S60.

# Seção 4

# Artigo científico

**“Effect of swim exercise on the urethral striated muscle  
myopathy of long-term mild STZ-induced diabetes  
pregnant rats”**

Artigo elaborado seguindo as normas da revista “The Journal of Physiology” – A2 na Medicina III. Fator de impacto 4.95

**Effect of swim exercise on urethral striated muscle myopathy of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats**

Urethral striated muscle and swim exercise

**Bruna B. Catinelli<sup>1</sup>⊕‡, Patrícia S. Rossignoli<sup>2</sup>⊕‡, Aline M. Carr<sup>1</sup>\*, Karina S. Suyama<sup>2</sup>\*, Gabriele B. Rabadan<sup>2</sup>\*, Lívia M. Nascimento<sup>2</sup>\*, Juliana N. Fernandes<sup>2</sup>\*, Maria Angélica Spadella<sup>3</sup>\*, Denise Haibara<sup>2</sup>\*, Juliana F. Floriano<sup>1</sup>\*, Angélica M. P. Barbosa<sup>2</sup>⊕•, Marilza V. C. Rudge<sup>1</sup>⊕•, Diamater Study Group<sup>1</sup>^**

<sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physiotherapy and Occupational Therapy, School of Philosophy and Sciences, São Paulo State University (UNESP), Marília, São Paulo State, Brazil.

<sup>3</sup> Marília Medical School (FAMEMA), Marília, São Paulo State, Brazil.

⊕These authors contributed equally to this work.

‡ BBC and PSR are first authors on this work.

\* These author contributed equally to this work.

• AMPB and MVCR are last authors on this work

**^Diamater Study Group:** Rudge MVC, Barbosa, AMP, Caldeiron IMP, Souza FP, Hijas A, Sobrevia L, Palma MS, Graeff CFO, Arni RK, Herculano RD, Salvadori DF, Mateus S, Dal Pai Silva M, Magalhães CG, Costa RA, Lima SAM, Emanuelli C, Felisbino S, Barbosa W, Atallah A, Girão MJB, Di Bella Z, Uchoa SM, Payão S, Berghman B, De Bie R, Junginger B, Alves FCB, Rossignoli PS, Abbade J, Prudencio CB, Orlandi MIG, Gonçalves MI, Nunes SK, Catinelli BB, Quiroz S, Sarmento BV, Pinheiro FA, Sartorão CI, Quiroz SBCV, Reyes DRA, Enriquez EMA, Oliveira RG, Floriano JF, Marcondes JPC, Sarmento, Costa SMB, Dangiό TD, Pascon T, Hallur LSR, Melo JVF, Takano L, Reis FVDS, Caldeirão TD, Carr AM, Garcia GA, Rabadan GB, Bassin HCM, Suyama KS, Damasceno LN, Takemoto MLS, Menezes MD,

Bussaneli DG, Nogueira, VKC, Lima PR, Lourenço IO, Marostica de Sá J, Megid RA, Caruso IP, Rasmussen LT, Prata GM, Piculo F, Vesentini G, Arantes MA, Ferraz GAR, Camargo LP, Kron MR, Corrente JE, Nunes HRC.

### **Corresponding author**

Prof. Marilza Vieira Cunha Rudge

Department of Gynecology and Obstetrics

Botucatu Medical School

E-mail: [marilzarudge@gmail.com](mailto:marilzarudge@gmail.com)

**Funding:** This work received a scholarship from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) protocol number 2018/03361-8 to BBC. MVCR received financial assistance to develop the thematic project from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) protocol number 2016/01743- 5. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Key words:** gestational diabetes mellitus, urethra, striated muscle, exercise, rats

### **Key points summary**

- Our idea was explore treatment possibilities aiming to reverse the alterations. The exercise is well known for its benefits on hyperglycemia, but its impact on urethral striated muscle impairment is not elucidated, inspiring the present work.
- The results showed that long-term mild diabetes and swim exercise decreased blood vessels area in urethral striated muscle, which might represent a deleterious effect on vascular function of the studied muscle.
- Further investigations should be made aiming to develop the most efficient exercise protocol to treat diabetes-induced changes in urethral striated muscle and in the future be able to apply in women with GDM.

## Abstract

*Introduction:* Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is related to high prevalence of pregnancy specific urinary incontinence (PSUI) and pelvic floor muscle dysfunction. Long-term mild diabetes demonstrated changes in urethral striated muscle of pregnant rats, and swim exercise may be able to minimize or treat diabetic myopathy. *Methods:* At the first day of birth Wistar newborns received Streptozotocin 100 mg/kg (diabetic group) or citrate buffer (control group) subcutaneously. At adult life, after mating, the animals were distributed in control – sedentary and exercised and diabetic – sedentary and exercised groups, starting the swim exercise protocol on gestational day 0 (60 minutes/day, 6 days/week). On 21<sup>st</sup> day of pregnancy urethra and vagina were extracted and the sections were cut and analyzed by Hematoxylin & Eosin and Masson's Thricrome staining to morphometric analysis, and Transmission Electron Microscopy to ultrastructural analysis. *Results:* Decreased blood vessels area were observed in the urethral striated muscle of both diabetic groups and control – sedentary non-diabetic group. No differences were found in total area, striated muscle area, smooth muscle area, urothelium area, total collagen area, collagen in striated muscle area and collagen in smooth muscle area. However, ultrastructural analysis showed sarcomeres disruption areas in diabetic – sedentary diabetic group. *Conclusions:* The present study demonstrated that long-term mild diabetes and swim exercise decreased blood vessels area in the urethral striated muscle of pregnant rats, with ultrastructural changes in the studied muscle. It is possible to suggest a deleterious effect of diabetes on the structure of urethral striated muscle, without reversing diabetes-induced changes by aquatic exercise.

## Introduction

Gestational Diabetes Mellitus is defined as glucose intolerance first recognised in the second or third trimester of pregnancy without previous diagnosis of type I and type II diabetes (American Diabetes Association, 2019). Gestational hyperglycemia is related to maternal-fetal injuries (American Diabetes Association, 2019), including the complaint of involuntary leakage of urine during pregnancy, named Pregnancy Specific Urinary Incontinence (PSUI) (Hvidman et al., 2002).

It is reported that Urinary Incontinence (UI) affects at least 40% of pregnant women (Morkved; Bo, 1999; Wesnes et al., 2007) and 30-40% of women after delivery (Morkved; Bo, 1999; Johannessen et al., 2018), suggesting that both pregnancy and post partum are related to UI. However, the etiology of PSUI and post partum period still remain unclear.

The crosstalk between GDM and PSUI is not completely elucidated, but it is known that independent of the type of diabetes, this condition is related to injuries in skeletal muscle health and function, defined as diabetic myopathy (Hernandez-Ochoa et al., 2017; Monaco et al., 2017). A high prevalence of PSUI and pelvic floor muscle dysfunction (PFMD) 2 years after cesarean section in women with GDM was found (Barbosa et al., 2011), showing a relationship between GDM, PSUI and diabetic myopathy.

However, human clinical studies present ethical restrictions, which turns translational studies relevant to understand the role of GDM in the pathophysiology of UI development. Thus, our research group developed experimental studies using models of streptozotocin (STZ) induced long-term mild diabetes (blood glucose level 120-300 mg/dl) and short-term severe diabetes (blood glucose level >300 mg/dl) in pregnant rats demonstrated changes in the urethral striated muscle, such as atrophy,

disorganization, decreased fast twitch fibers and increased slow twitch fibers (Piculo et al., 2014, Marini et al., 2017). These findings confirm clinical data that PSUI in women with GDM are related to PFMD (Barbosa et al., 2011) and suggest that PSUI may occur due to changes in urethral striated muscle, which can lead to insufficient functioning of urethral sphincter (Heesakkers & Garretsen, 2004).

Thus, the development of therapeutic strategies to minimize or treat the deleterious effect of diabetes is necessary. Physical exercise during pregnancy is effective on glycemic control and can prevent GDM and diabetes complications (Colberg et al., 2013, Di Biase et al., 2018, American Diabetes Association, 2019), including diabetic myopathy. Different modalities of exercise are recommended during pregnancy, including land exercise, such as walking, running, dancing and water exercise, such as swimming and aquatic activities (Colberg et al., 2013), but aquatic exercise showed to be more effective to prevent GDM compared to land exercise, and also presents improvement of mobility, low risk of falling and abdominal trauma (Colberg et al., 2013; Barakat et al., 2017). However, the effect of swim exercise on diabetic myopathy in women with GDM is not elucidated.

In addition, experimental studies have demonstrated beneficial effects of swim exercise and resistance training on the myopathy of gastrocnemius and soleus muscles in a rat model of type 2 diabetes (17, 18), which means that exercise practice can also delay or prevent diabetic myopathy. However, the literature does not provide experimental studies evaluating the effect of swim exercise on diabetic myopathy of pregnant rats.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of swim exercise protocol on the myopathy of urethral striated muscle of long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats. To our knowledge the present study is the first

investigation about exercise practice on diabetic myopathy of urethral striated muscle of diabetic pregnant rats.

## **Methods**

### **Ethical Approval**

This experimental study was developed at Physiological Sciences Laboratory and approved by the Ethics Committee on Animal Experiments nº 007/2016, both from São Paulo State University (UNESP).

### **Animals**

Female and male Wistar rats were housed in plastic cages during all experimental protocol, maintained under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) and humidity ( $50 \pm 10\%$ ), in a 12 hour light-dark cycle, with food and water *ad libitum*.

### **Experimental diabetes induction**

On the first day of life, half of the female newborns received intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ) (Sigma®) diluted in citrate buffer (0.1 mol/l pH 4.5) at dose of 100 mg/kg. The other half of the females was submitted only to the administration of citrate buffer (0.1 mol/l pH 4.5) (Sinzato et al., 2011). All newborn rats (NB) were maintained with their mothers until the end of the lactation period (21 days). After this period, the mother rats were killed with an excessive dose of anesthetic (Thiopentax® - 80 mg/kg).

In adult life only diabetic rats with blood glucose level between 120 mg/dL – 300 mg/dL and non-diabetic rats with blood glucose level <120 mg/dl were included in

the experimental groups (lessi et al., 2010).

### **Mating**

At approximately 90 days of age, each four female rats were mated overnight with one male rat for the maximum period of 15 days. A vaginal smear was performed everyday in the morning, considering gestational day 0 if spermatozoa were found (Damasceno et al., 2008).

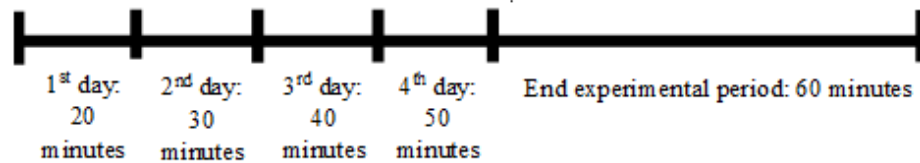
### **Experimental Groups**

On day 0 of pregnancy, non-diabetic and diabetic pregnant rats were distributed in four groups: Control – Sedentary Non-Diabetic (C), Control – Exercised Non-Diabetic (Cex), Diabetic – Sedentary Diabetic (D) and Diabetic – Exercised Diabetic (Dex).

### **Swim Exercise Protocol**

The exercised groups (Cex and Dex) started the protocol of swim exercise on gestational day 0 until gestational day 20, at a depth of 40 cm at water temperature  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  and frequency of 6 days/week (Figure 1). The protocol started with 20 minutes at the first day, with progressive increases of 10 minutes/day until 60 minutes (Marangon et al., 2002; Manchado et al., 2006; Volpato et al., 2009). The C and D rats were exposed since gestational day 0 until gestational day 20, for 15 minutes at a depth of 10 cm at water temperature  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  and frequency of 6 days/week aiming not to promote physiological adaptations from exercise practice

## Swim exercise protocol



**Fig. 1:** Experimental sequence of the swim exercise protocol

### Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

On the 17<sup>th</sup> day of pregnancy the females were submitted to the OGTT to confirm the glucose intolerance in diabetics (Sinzato et al., 2011). Before the test, fasting blood glucose level was measured, followed by intragastric administration of glucose solution (0.2 g/mL) at a dose of 2.0 g/kg. Blood glucose levels were measured at 10, 20, 30, 60 and 120 minutes after administration of the solution and it was considered diabetes when two or more blood glucose measurements were >140 mg/dL (Nascimento, 2014).

### Tissue extraction

On 21<sup>st</sup> day of pregnancy the animals were anesthetized by intramuscular ketamine-xylazine injection (10:1, 0.5 ml/300g body weight), followed by decapitation. The inguinal region were exposed to dissection of both urethra and vagina. The urethra and vagina were extracted as a unit to facilitate their handling. All analyses were performed at the same points along the urethral longitudinal axis of the midurethra region in which the striated muscle layer becomes denser.

### **Morphological analysis**

The samples obtained to morphological analysis were stocked in 10% buffered formaldehyde for 24 hours, transferred to 70% alcohol and maintained at room temperature and embedded in paraffin. The fragments were sectioned in microtome (Reichert-Jung model 820) and fixed of microscope glass slides stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) and Masson's Trichrome (3 samples from C group, 6 samples from D group, 5 samples from Cex group and 4 samples to Dex group).

H&E-stained slides were used to observe the general morphology of the urethra and determine urethral tissue cross-sectional area. Masson's-trichrome-stained slides were used for morphometric analysis of total area, striated muscle area, smooth muscle area, total collagen area, collagen area in the striated muscle, and collagen area in the smooth muscle, urothelium area and blood vessels area (Magnification 4x). The slides were analyzed in light microscope (Olympus Corporation®/BX50 coupled with DP73 digital camera, Olympus). The photographs were obtained with *cell Sens* Ver 1.18 Olympus Corporation® software (Magnification 4x).

The samples obtained to ultrastructural analysis (3 samples/group) had isolated urethra exctraton and immediatley fixed in Karnovsky for 3 hours at room temperature and transferred to the refrigerator to post-fixation in osmium tetroxide. Subsequently, specimens were embedded in resin and areas of interest were seleced and ultra-thin cuts were performed. The investigators controlled the longitudinal axis (i.e., proximal to distal) of the urethra by using permanente ink pen markings to identify the distal urethra. The sections were obtained using an ultramicrotome at a longitudinal orientation, and stained sections were examined using transmission electron microscope (JEM 1400, JEOL®).

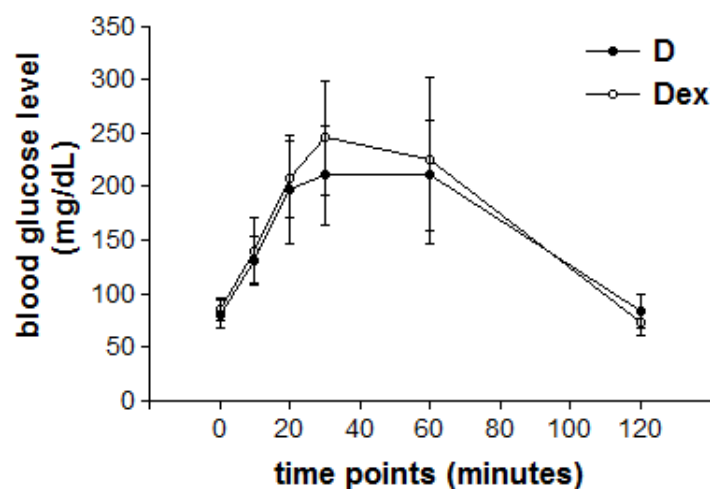
## Statistical analysis

Parametric data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons of the measurements between groups were performed with Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Non-parametric data (blood vessel area) were expressed as median with interquartile range. Comparisons of the measurements between groups were performed with Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test. All analyses were performed using the GraphPad Prism<sup>®</sup> v. 8.0 software. Statistical significance was considered to be  $p < 0.05$ .

## Results

### *Maternal glycemia*

The OGTT showed that D and Dex rats had two or more blood glucose measurements  $>140$  mg/dl. These data confirm that the induction of long-term mild diabetes was efficient, including the animals in the experimental groups. The swim exercise practice during pregnancy did not promote changes in blood glucose levels (Figure 2).



**Fig. 2.** Oral glucose tolerance test. Blood glucose level before the test and 10, 20, 30, 60 and 120 minutes after the administration of intragastric glucose solution in D and Dex groups.

*Control – Sedentary Non-Diabetic group (C)*

The morphometric analysis showed values of total area ( $6.197.680 \pm 1.643.357 \mu\text{m}^2$ ), striated muscle area ( $4.305.945 \pm 2.161.640 \mu\text{m}^2$ ), smooth muscle area ( $2.966.781 \pm 883.716 \mu\text{m}^2$ ), urothelium area ( $302.055 \pm 38.378 \mu\text{m}^2$ ) and blood vessels area ( $10.492 [5.132 - 22.350]$ ). Also, total collagen area ( $1.563.938 \pm 221.327 \mu\text{m}^2$ ), collagen in striated muscle area ( $822.183 \pm 285.049 \mu\text{m}^2$ ) and collagen in smooth muscle area ( $741.755 \pm 211.038 \mu\text{m}^2$ ) were shown (Figures 3 and 4A). The ultrastructural analysis showed well organized myofibrills forming intact sarcomeres. Also, intermyofibrillar and subsarcolemal mitochondria, lipid droplets, glycogen granules and vacuoles containing myelin were found (Figure 5A and 5B).

*Control – Exercised Non-Diabetic (Cex)*

The morphometric analysis showed decrease in the blood vessels area ( $5.273 [1.955 - 11.716]$ ) compared to C group ( $p < 0.0001$ ). Also, there was no difference in total area ( $5.753.939 \pm 1.130.913 \mu\text{m}^2$ ), striated muscle area ( $3.209.459 \pm 1.074.789 \mu\text{m}^2$ ), smooth muscle area ( $2.262.185 \pm 476.548 \mu\text{m}^2$ ), urothelium area ( $282.295 \pm 231.535 \mu\text{m}^2$ ), total collagen area ( $1.125.084 \pm 276.959 \mu\text{m}^2$ ), collagen in striated muscle area ( $523.231 \pm 211.424 \mu\text{m}^2$ ) and collagen in smooth muscle area ( $601.853 \pm 202.732 \mu\text{m}^2$ ) compared to C and D groups (Figures 3 and 4B). Ultrastructural analysis showed disorganized Z lines and intact sarcomeres. Intermyofibrillar and subsarcolemal mitochondria, lipid droplets, glycogen granules and vacuoles containing myelin were found (Figure 5C and 5D).

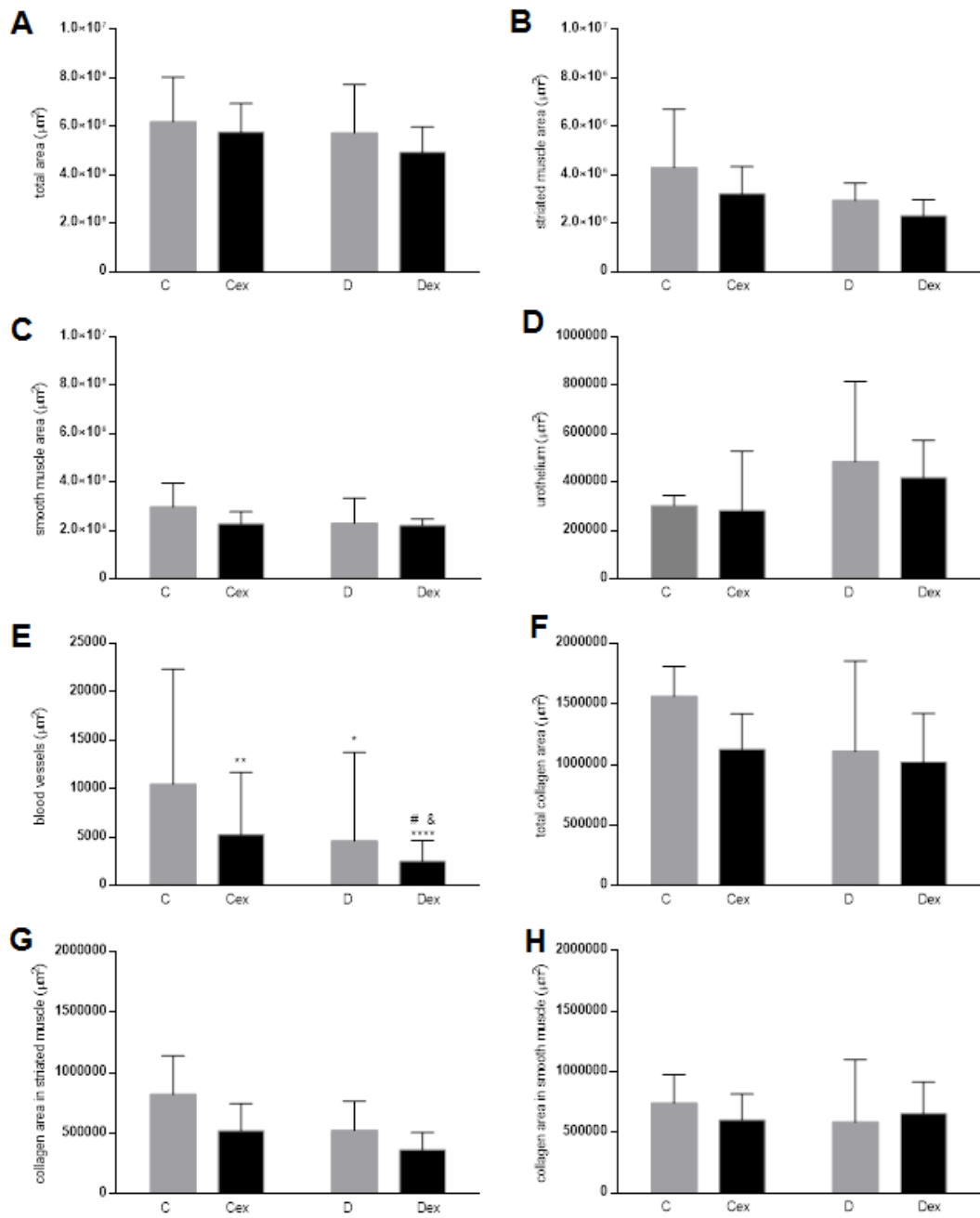
*Diabetic – Sedentary Diabetic group (D)*

The morphometric analysis showed decrease in the blood vessels area

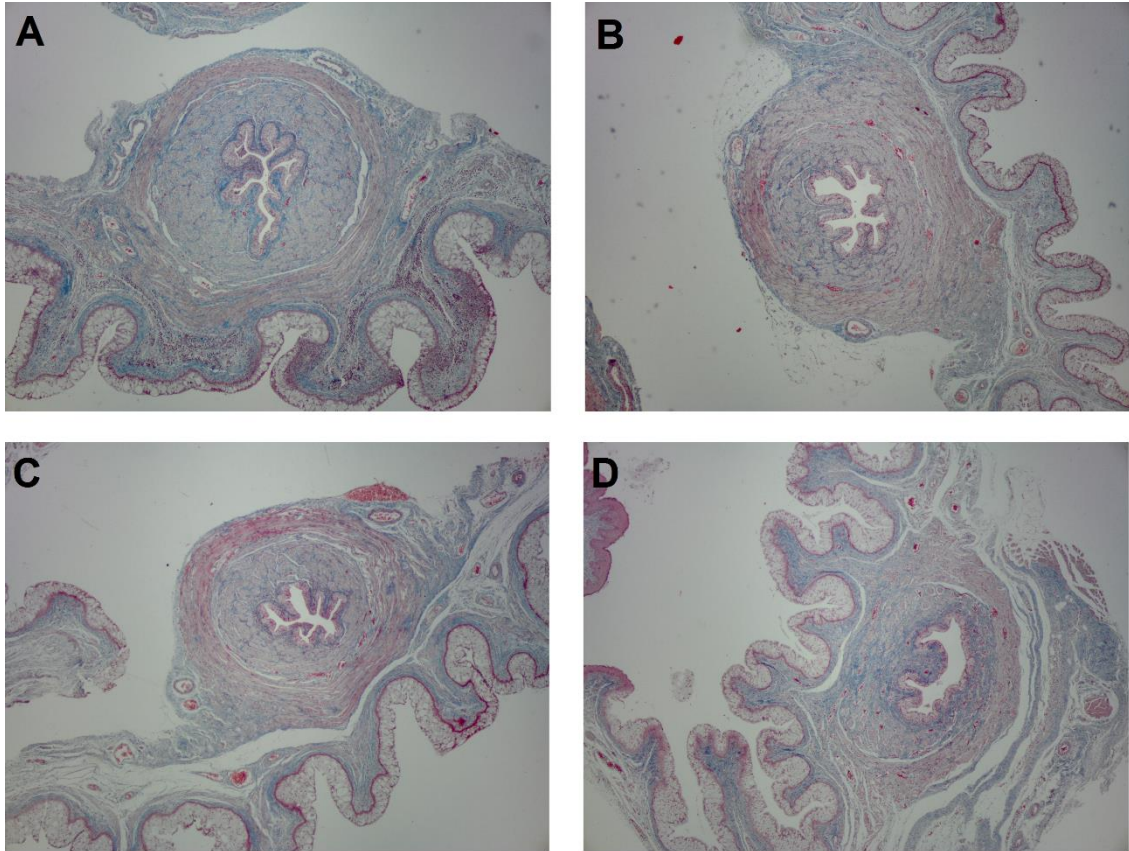
(4.612 [2.150 – 13.759]) compared to C group ( $P < 0.0001$ ). Also, there was no difference in total area ( $5.737.021 \pm 1.897.036 \mu\text{m}^2$ ), striated muscle area ( $2.946.962 \pm 688.222 \mu\text{m}^2$ ), smooth muscle area ( $2.305.500 \pm 984.620 \mu\text{m}^2$ ), urothelium area ( $484.560 \pm 315.008 \mu\text{m}^2$ ), total collagen area ( $1.111.087 \pm 710.019 \mu\text{m}^2$ ), collagen in striated muscle area ( $525.621 \pm 228.323 \mu\text{m}^2$ ) and collagen in smooth muscle area ( $585.466 \pm 491.361 \mu\text{m}^2$ ) compared to C, Cex and Dex groups (Figures 3 and 4C). In contrast to C group, ultrastructural analysis showed disorganized Z lines and sarcomeres disruption. Intermyofibrillar and subsarcolemal mitochondria, lipid droplets, glycogen granules and vacuoles containing myelin were found (Figure 5E and 5F).

#### *Diabetic – Exercised Diabetic group (Dex)*

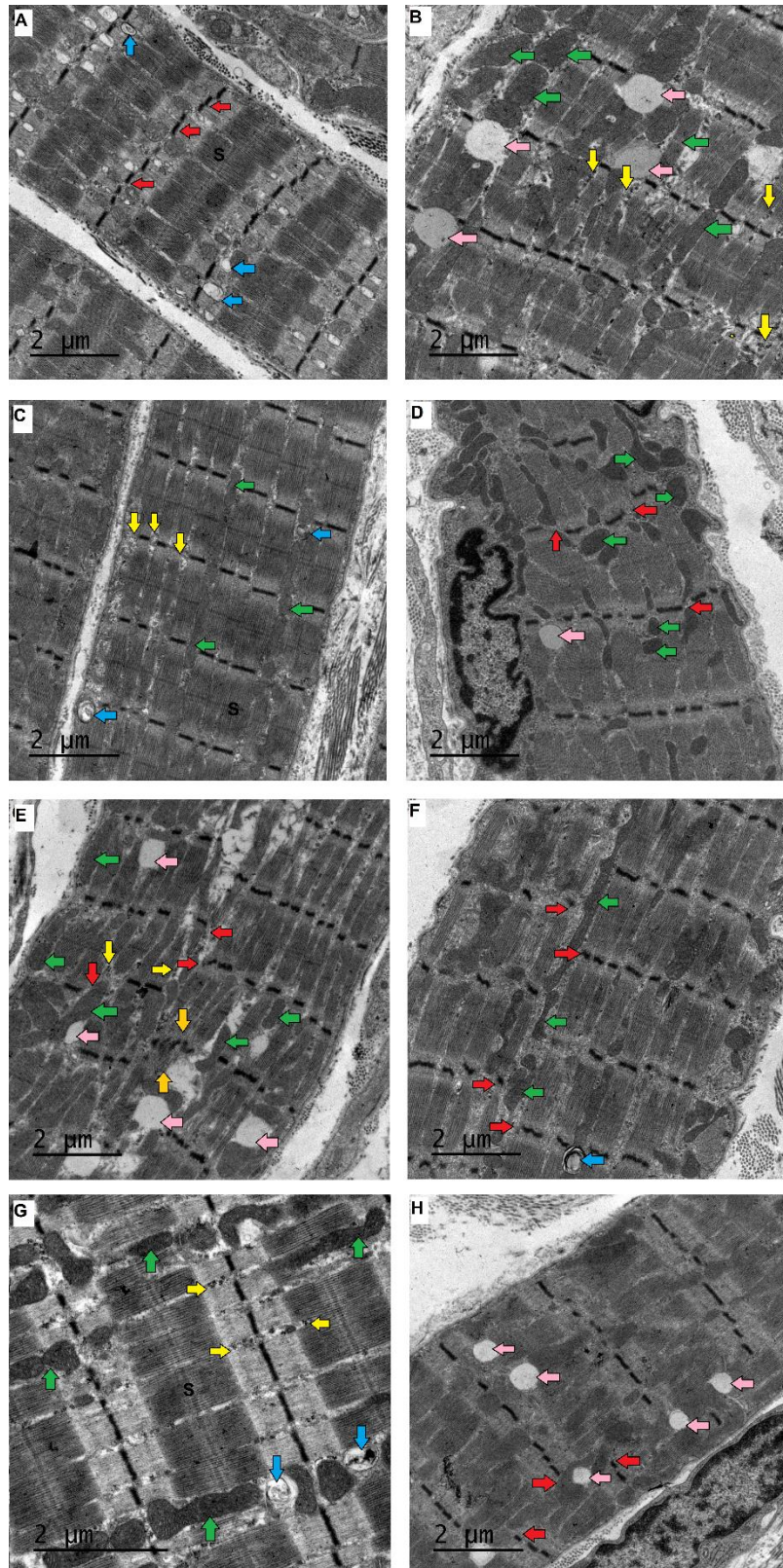
The morphometric analysis showed decrease in the blood vessels area (2.521 [1.620 – 4.663]) compared to Cex group ( $p < 0.0001$ ), D group ( $p < 0.0001$ ) and C group ( $p < 0.0001$ ). Also, there was no difference in total area ( $4.925.031 \pm 973.572 \mu\text{m}^2$ ), striated muscle area ( $2.300.277 \pm 636.799 \mu\text{m}^2$ ), smooth muscle area ( $2.206.458 \pm 255.197 \mu\text{m}^2$ ), urothelium area ( $418.296 \pm 141.469 \mu\text{m}^2$ ), total collagen area ( $1.020.577 \pm 371.591 \mu\text{m}^2$ ), collagen in striated muscle area ( $364.890 \pm 131.534 \mu\text{m}^2$ ) and collagen in smooth muscle area ( $655.687 \pm 240.897 \mu\text{m}^2$ ) compared to Cex, D and C groups (Figures 3 and 4D). In contrast to D group, ultrastructural analysis showed intact sarcomeres. Disorganized Z lines, intermyofibrillar and subsarcolemal mitochondria, lipid droplets, glycogen granules and vacuoles containing myelin were found (Figure 5G and 5H).



**Fig. 3:** Analysis of total area (A), striated muscle area (B), smooth muscle area (C), urothelium area (D), blood vessels area (E), total collagen area (F), collagen in striated muscle area (G) and collagen in smooth muscle area (H) from control – sedentary and exercised non-diabetic and diabetic – sedentary and exercised diabetic. \*, \*\*, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . #Related to D and &related to Cex



**Fig. 4:** Urethral striated muscle after Masson's Trichrome staining to detect collagen (blue). Control – Sedentary Non-Diabetic (A), Control – Exercised Non-Diabetic (B), Diabetic – Sedentary Diabetic (C) and Diabetic – Exercised Diabetic (D). Magnification 4x. Scale bar: 100 $\mu$ m.



**Fig 5.** Electron micrographs of urethral striated muscle from control – sedentary non-diabetic (A and B), control – exercised non-diabetic (C and D), diabetic – sedentary diabetic (E and F) and diabetic – exercised diabetic (G and H). The micrographs show well organized myofibrills (A, red arrows) forming intact sarcomeres (S), disorganized Z lines (C, D, F and H, red arrows), myelin figures (blue arrows), lipid droplets (pink arrows), sarcomeres disruption (orange arrows), glycogen granules (yellow arrows) and intermyofibrillar and subsarcolemal mitochondria (green arrows). Scale bar: 2 $\mu$ m.

## Discussion

The present study showed that swim exercise in long-term mild STZ-induced diabetes pregnant rats was responsible to decrease the blood vessels area in the urethral striated muscle. Surprisingly, diabetic pregnant rats submitted to swim exercise showed even smaller blood vessels area, suggesting that both diabetes and exercise may have a deleterious effect on vascular function in the urethral striated muscle. Also, there was no difference between groups in total area, striated muscle area, smooth muscle area, urothelium area, total collagen area, collagen in striated muscle area and collagen in smooth muscle area, which means that neither diabetes nor exercise altered these parameters.

It is well established that adequate perfusion is essential to muscle mass maintenance, and both type 1 and type 2 diabetes are related to microvascular and macrovascular dysfunction, affecting several tissues, including skeletal muscle (Benedict et al., 2011; Groen et al., 2014). However, studies that evaluate microvascular function of urethral striated muscle in diabetic pregnant rats are limited. Previous findings showed increase in blood vessels area associated to structural changes in the urethral striated muscle (Piculo et al., 2014), which are not consistent to the present data. On the other hand, corroborating our findings, the deleterious effect of diabetes on skeletal muscle microvascular function is reported in experimental study, that showed decreased microvascular branching and a 44% decrease in capillary flow to spinotrapezius muscles in a rat model of type 2 diabetes (Benedict et al., 2011). Additionally, a clinical study showed decreased muscle mass accompanied by lower capillary density and reduction in perfusion capacity in vastus lateralis muscle of type 2 diabetic men, attributing the loss of skeletal muscle mass to the microvascular structure and function diabetes-induced changes (Groen et al., 2014).

Our hypothesis was that swim exercise would improve the deleterious effect of moderate diabetes on blood vessels area of urethral striated muscle. However, we observed that exercise alone and associated to diabetes resulted in even smaller blood vessels area. In contrast to our findings, exercise training seems to be effective to improve blood flow and capillary diffusion capacity in skeletal muscle, and also induce vascular structural adaptations, including remodeling and enlargement of arteries and arterioles (Laughlin, 2015). In type 2 diabetic patients, a 11-week bicycle endurance training (40 minutes/day, 3 days/week) resulted in increased perfusion capacity and larger capillary lumen compared to a 11-week bicycle high intensity interval training (20 minutes/day, 3 days/week), which those benefits were not observed (Mortensen et al., 2018). Also, long-term exercise training on a treadmill (60 minutes/day, 5 days/week for 12 weeks) restored blood flow of the gracilis muscle in a rat model of type 2 diabetes (Machado et al., 2016).

Although the structure of urethral striated muscle showed no difference in the morphometric analysis, ultrastructural analysis showed sarcomeres disruption areas in diabetic rats and disorganized Z lines caused by swim exercise and diabetes. Sarcomeres disruption areas and myofibrils misalignment may represent alterations in contractile capacity of the muscle, decreasing the force-generating capacity (Salazar; Michele; Brooks, 2010). However, the sarcomeres disruption areas were not observed DE group, suggesting that the aquatic exercise may have a beneficial effect on the structure of urethral striated muscle.

We attributed the absence of difference in the structure of urethral striated muscle in the morphometric analysis to the small sample size. Previous studies showed thin, atrophic and disorganized urethral fibers with increased collagen in striated muscle area, decrease in the proportion of fast to slow fibers and ultrastructural

changes, such as accumulation of mitochondria and increased lipid droplets in experimental models of moderate and severe diabetes (Piculo et al., 2014; Marini et al., 2017). Our data may suggest an increase in striated muscle area and decrease in collagen area in Cex rats, which could represent a beneficial effect of swim exercise. However, in Dex it is possible that striated muscle area decreased and collagen area did not change, which may represent a deleterious effect of swim exercise. Also, swim exercise did not control blood glucose level, which may be contributing to those changes. Our hypothesis is that the increase in sample size would show diabetes-induced structural changes, correlate those changes to the decrease in the blood vessels area and confirm the real effect of aquatic exercise on the myopathy of urethral striated muscle in long-term mild diabetic pregnant rats.

In addition, this study presents limitation regarding frequency and duration of the exercise sessions, because they do not entirely represent clinical conditions. The guidelines recommend that pregnant women should exercise at least 150 minutes/week or 30 minutes/day most days of week (Colberg; Castorino; Jovanovič, 2013; Di Biase et al., 2018; American Diabetes Association, 2019). Thus, different frequencies and duration of the exercise sessions should be explored with the aim of develop an efficient aquatic exercise protocol to treat diabetic myopathy in pregnant rats, and in the future, be appropriate to diabetic pregnant women as well. Also, moderate diabetes induction occurred before pregnancy, which does not represent the clinical condition of GDM, suggesting that future studies should consider develop a model of induction that mimics GDM not only in blood glucose levels, but also the time of exposure to hyperglycemia.

In conclusion, our results demonstrated that diabetes and swim exercise resulted in decreased blood vessels area in the urethral striated muscle of pregnant

rats, with ultrastructural changes in the studied muscle. Despite the absence of morphological changes, it is possible to suggest a deleterious effect of diabetes, without reversing diabetes-induced changes by swim exercise.

### **Aknowledgements**

The authors would like to thank the staff from the Physiological Sciences Laboratory, specially A. Nascimento (Unesp, campus of Marília) and P. Georgete from Pathology Laboratory (Unesp, campus of Botucatu). Transmission electron microscopy images were obtained at the Centre of Microscopy and Image (CMI), Piracicaba Dental School, UNICAMP and the technical support of Flavia Sammartino Mariano Rodrigues is appreciated. The study was financially supported by fellowship grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/03361-8).

### **References**

- American Diabetes Association et al. (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, v. 42, n. Supplement 1, p. S13-S28
- American Diabetes Association (2019). 5. Lifestyle management: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 42(1), S46-S60.
- Barakat R, Perales M, Cordero Y, Bacchi M, Motolla M. Influence of Land or Water Exercise in Pregnancy on Outcomes: A Cross-sectional Study. *Medicine and science in sports and exercise* 2017; 49(7):1397-1403

- Barbosa AMP, Dias A, Marini G, Calderon IMP, Witkin S, Rudge MVC (2011). Urinary incontinence and vaginal squeeze pressure two years post-cesarean delivery in primiparous women with previous gestational diabetes mellitus. *Clinics* 66(8), 1341–6.
- Benedict KF, Coffin GS, Barrett EJ, Skalak TC (2011). Hemodynamic systems analysis of capillary network remodeling during the progression of type 2 diabetes. *Microcirculation*, 18(1), 63-73.
- Colberg SR, Castorino K, Jovanović L (2013). Prescribing physical activity to prevent and manage gestational diabetes. *World journal of diabetes* 4(6), 256–62.
- Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consoni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR (2008). *Anomalias congênitas: estudos experimentais*. 1 ed. Belo Horizonte: Coopmed.
- Di Biase N, Balducci S, Lencioni C, Bertolotto A, Tumminia A, Dodesini AR et al. (2018). Review of general suggestions on physical activity to prevent and treat gestational and pre-existing diabetes during pregnancy and in postpartum. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*.
- Groen BB, Hamer HM, Snijders T, van Kranenburg J, Frijns D, Vink H, van Loon LJ (2014). Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 116: 998–1005.
- Haylen BT, Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J et al (2010). An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourology and Urodynamics: Official Journal of the International Continence Society* 29(1), 4-20.
- Heesakkers JP, Gerretsen RR (2004) Urinary incontinence: sphincter functioning from a urological perspective. *Digestion [Review]* 69(2): 93–101
- Hernández-Ochoa EO, Llanos P, Lanner JT (2017). The Underlying Mechanisms of

Diabetic Myopathy. *Journal of diabetes research* 2017, 3-6.

Hilton P, Dolan, LM (2004). Pathophysiology of urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 111, 5-9.

Hvidman L, Foldspang A, Mommsen S, Nielsen JB (2002). Correlates of urinary incontinence in pregnancy. *International Urogynecology Journal* 13(5), 278-283.

lessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr* 2010; 2: 37, doi: 10.1186/1758-5996-2-37

Johannessen HH, Stafne SN, Falk RS, Stordahl A, Wibe A, & Mørkved S (2018). Prevalence and predictors of double incontinence 1 year after first delivery. *International urogynecology journal* 29(10), 1529-1535.

Laughlin MH (2016). Physical activity-induced remodeling of vasculature in skeletal muscle: role in treatment of type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 120: 1–16.

Machado MV, Martins RL, Borges J, Antunes BR, Estado V, Vieira AB, Tibirica E (2016). Exercise training reverses structural microvascular rarefaction and improves endothelium-dependent microvascular reactivity in rats with diabetes. *Metabolic syndrome and related disorders*, 14(6), 298-304.

Manchado FDB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MARD (2006). Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 259-262.

Marangon L, Gobatto C, de Mello M, Kokubun E (2002). Utilization Of An Hyperbolic Model For The Determination Of The Critical Load In Swimming Rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 34(5), 149.

Marini G, Barbosa AMP, Damasceno DC, Matheus SMM, de Aquino Castro R, Girão MJBC, Rudge MVC (2011). Morphological changes in the fast vs slow fiber profiles of

the urethras of diabetic pregnant rats. *Urogynaecologia* 25(1), e9.

Monaco CMF, Perry CGR, Hawke, TJ (2017). Diabetic myopathy: current molecular understanding of this novel neuromuscular disorder. *Current opinion in neurology* 30(5), 545-552.

Mørkved S, Bø K (1999). Prevalence of urinary incontinence during pregnancy and postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 10, 394–398.

Mortensen SP, Winding KM, Iepsen UW, Munch GW, Marcussen N, Hellsten Y, Baum O (2019). The effect of two exercise modalities on skeletal muscle capillary ultrastructure in individuals with type 2 diabetes. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 29(3), 360-368.

Nascimento LLS (2014). Avaliação de diferentes modelos de indução do diabetes moderado em ratas Wistar e suas repercussões no organismo materno-fetal. Instituto de Biociências Campus de Botucatu.

Piculo F, Marini G, Mércia A, Barbosa P (2014). Urethral striated muscle and extracellular matrix morphological characteristics among mildly diabetic pregnant rats: translational approach. *International urogynecology journal* 25(3), 403-415.

Salazar JJ, Michele DE, Brooks SV (2010). Inhibition of calpain prevents muscle weakness and disruption of sarcomere structure during hindlimb suspension. *Journal of applied physiology*, 108(1), 120-127.

Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, Rudge MVC (2011). Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumornecrosis factor- $\alpha$  as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44(3), 206-211.

Volpato GT, Damasceno DC, Kempinas WG, Rudge MVC, Calderon IM (2009). Effect

of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reproductive biomedicine online* 19(6), 852-858.

Wesnes SL, Rortveit G, Bø K, Hunskaar S (2007). Urinary incontinence during pregnancy. *Obstet Gynecol* 109(4), 922–928.

# Seção 5

# **Dificuldades encontradas e meios para superá-las**

O objetivo desta seção é apresentar as principais dificuldades encontradas durante a realização do trabalho, e de que forma buscamos superá-los.

O presente trabalho apresentava como proposta analisar morfológicamente o músculo reto abdominal (MRA) e estriado uretral de ratas prenhes diabéticas submetidas a exercício em ambiente aquático por meio das seguintes técnicas:

- Hematoxilina-Eosina (HE) para análise geral da estrutura;
- Picrossirius Red e Tricrômico de Masson para detecção de colágeno;
- Imunoistoquímica para marcação de fibras musculares de contração rápida e lenta, e colágeno tipo I e tipo III.
- Microscopia eletrônica de transmissão para análise da ultraestrutura.

Também foi proposta do presente trabalho desenvolvê-lo no Laboratório de Ciências Fisiológicas da FFC/Unesp Marília. Trata-se de um laboratório novo, com início de suas atividades em 2016 e que com o apoio do Projeto Temático Diamater – FAPESP tem sido estruturado. Porém ainda nos encontramos em fase de montagem, com apoio técnico modesto e com poucos alunos desenvolvendo trabalhos, contando apenas comigo como aluna de pós-graduação até o presente momento.

Nosso primeiro desafio foi a obtenção do modelo experimental e execução do protocolo de exercício, com os quais nunca havíamos trabalhado. Com pouco espaço físico e recurso humano disponível, foi necessário muito planejamento para que o cronograma proposto fosse cumprido. Embora muitos problemas tenham ocorrido, tais como quebra de termostato, falta de suporte para o aquário, dificuldades no transporte dos animais, entre outros, estes foram superados.

Por ser também nossa primeira experiência com as análises propostas, houve

necessidade de padronizar a etapa de coleta de material, e para tanto contamos com a colaboração de técnicos e professores mais experientes para criação do protocolo. Dessa forma, para HE, Picrossirius Red, Tricrômico de Masson e Imunoistoquímica, optamos por fixar o material em formol tamponado a 10% por 24 horas, transferir para álcool 70% em temperatura ambiente e emblocar os materiais em parafina, para posteriormente confeccionar as lâminas histológicas.

Outras dificuldades surgiram após a padronização da coleta de materiais. Na análise das lâminas de músculo estriado uretral, notamos que os cortes obtidos na fase de processamento das amostras apresentavam diferentes orientações (transversal e longitudinal). Além disso, também notamos que os cortes foram feitos em diferentes regiões da uretra (proximal, medial e distal), e algumas lâminas não apresentavam material a ser analisado. Nosso interesse era apenas a orientação transversal da região medial da uretra. Diante disso, tentamos confeccionar novas lâminas, com o objetivo de padronizar todas as amostras na região medial da uretra. Porém, não obtivemos sucesso, o que acabou deixando nosso tamanho amostral muito pequeno, e já não havia tempo hábil para que novos grupos de animais fossem obtidos para nova coleta de material. Desta forma, a versão final desta dissertação conta com tamanho amostral pequeno de músculo estriado uretral por conta das dificuldades relatadas, o que certamente dificultou a análise estatística dos dados. Vale ressaltar que novos grupos de animais estão programados para nova coleta de material, de forma a adequar o tamanho amostral para publicação do trabalho.

Tivemos dificuldade também na análise das lâminas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Após a coleta de material, os mesmos foram enviados ao Centro de Microscopia Eletrônica, localizado no IB/Unesp Botucatu para o processamento. Porém, o microscópio estava quebrado, e não havia possibilidade de obtenção das

imagens em Botucatu. Dessa forma, após estabelecermos contato e autorização para uso do microscópio na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), nos deslocamos até lá para que pudéssemos obter as imagens.

Outra dificuldade encontrada foi em relação à padronização da imunistoquímica. Inicialmente, problemas surgiram na aquisição dos anticorpos, fazendo com que os mesmos não chegassem a tempo para realização da técnica, análise e apresentação dos resultados nesta dissertação. Desta forma, recorremos a outros pesquisadores que possivelmente teriam os anticorpos necessários, e conseguimos o empréstimo da anti-miosina rápida e lenta, e anti-colágeno III, faltando apenas o anti-colágeno I.

Com os anticorpos já em mãos, nos deparamos com outra dificuldade: as lâminas preparadas para imunistoquímica estavam parafinizadas, e os anticorpos emprestados eram específicos para material congelado. Portanto, iniciamos a busca pelos protocolos de desparafinização e recuperação antigênica mais efetivos para o material que estávamos trabalhando, com a insegurança a respeito da efetividade.

Inicialmente, foi realizada a tentativa de recuperação antigênica em micro-ondas, seguido de inibição da peroxidase, inibição de proteínas específicas, incubação com anticorpo primário por 18 horas a 4°C, seguido da incubação com anticorpo secundário por 2 horas, revelação com DAB e contra corar com hematoxilina para finalizar a montagem das lâminas. Porém não obtivemos sucesso na primeira tentativa, iniciando outros testes.

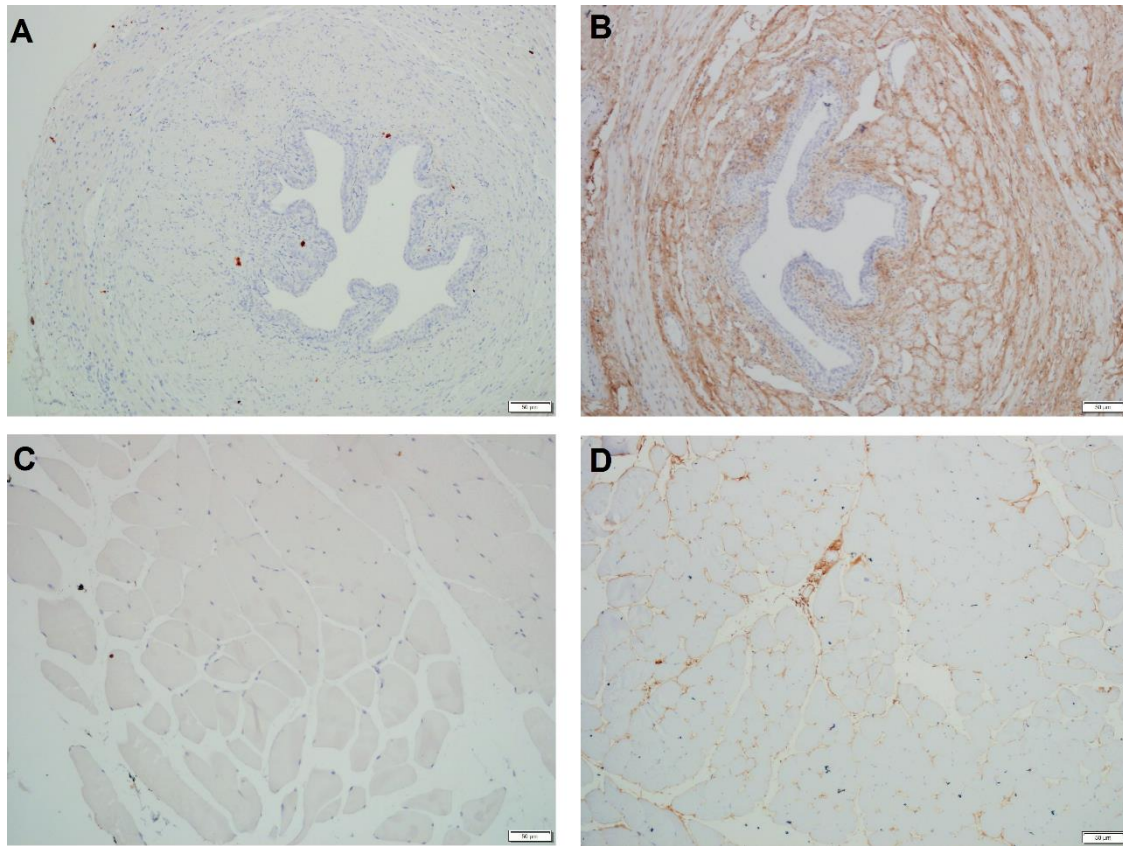
Contando com apoio de professores parceiros e na busca incessante por informações e protocolos que nos ajudariam, foram realizadas tentativas de recuperação antigênica na panela de pressão, preparo do tampão citrato no momento do uso, variações na inibição da peroxidase e de proteínas específicas, bem como

variação na concentração dos anticorpos primários. Porém, mesmo com as adequações realizadas, não obtivemos sucesso na padronização.

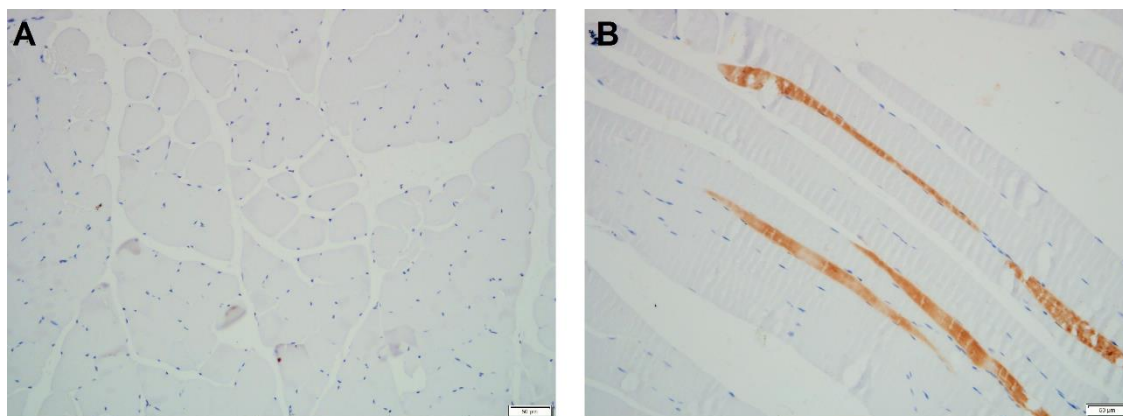
Desta forma, contando com a ajuda do Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino, de seus alunos de pós-graduação e da bolsista de Treinamento Técnico (TT) do Projeto Diamater e mestranda, Aline Medolago, nos deslocamos até Botucatu para que a padronização fosse realizada no Laboratório de Matriz Extracelular. Após ajustes no tempo da recuperação antigênica em panela de pressão, inibição da peroxidase, incubação com anticorpo secundário e preparo do DAB, finalmente conseguimos a marcação de fibras rápidas e lentas, e colágeno tipo III no MRA e no músculo estriado uretral.

Infelizmente não foi possível finalizar todas as lâminas a tempo de analisar e incluir os resultados na presente dissertação. Inclusive, alguns resultados morfométricos obtidos em músculo reto abdominal não foram apresentados em função da ausência da análise imunistoquímica, o que comprometeria uma discussão adequada dos resultados. Porém a continuidade da técnica e das análises têm sido feitas em paralelo, a fim de que possamos incluir os resultados referentes à imunistoquímica no relatório final da bolsa de Mestrado FAPESP e nos artigos oriundos do presente trabalho.

A fim de exemplificar as dificuldades relatadas, as imagens abaixo representam algumas tentativas de padronização da imunistoquímica



**Figura 1: Padronização da imunoistoquímica para marcação de colágeno tipo III.** Músculo estriado uretral e músculo reto abdominal após o procedimento sem sucesso (A e C) e após ajustes no protocolo (B e D).



**Figura 2: Padronização da imunoistoquímica para marcação de fibras de contração lenta.** Músculo reto abdominal após o procedimento sem sucesso (A) e após ajustes no protocolo (B).

Cada dificuldade serviu de grande aprendizado e contribuiu muito para nosso crescimento científico e cada superação nos impulsionou para que pudéssemos dar continuidade nos trabalhos.

# Seção 6

**Anexos**

## Anexo 1: Aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA)



FLS.	27
PROC. Nº	1183/2016
RUBRICA	

### CERTIFICADO 007/2016

Certificamos que a proposta intitulada “ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO MÚSCULO RETO ABDOMINAL E PERIURETRAL DE RATAS PRENHES COM DIABETE MODERADO SUBMETIDAS A PROGRAMA DE NATAÇÃO”, registrada sob o protocolo nº 1183/2016, sob a responsabilidade de Angélica Mércia Pascon Barbosa, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FFC – UNESP do Campus de Marília, em reunião de 22/09/2016.

Finalidade	( ) Ensino      (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 09/2016 a 08/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato/ Wistar
Nº de animais	90
Peso/Idade	400g/110-120 dias
Sexo	F
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina de Marília

Marília, 22 de setembro de 2016.

**Dra. Luciana Pinato**  
 Presidente da CEUA-FFC da UNESP-  
 Câmpus de Marília

## Anexo 2: Justificativa de alteração em título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



### MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA\*

**Objetivo Acadêmico:** Dissertação de Mestrado

Título constante no parecer de aprovação:

Análise morfológica e molecular dos músculos reto abdominal e periuretral de ratas prenhes com diabetes moderado submetidas a programa de natação

Título final (constante na capa da dissertação):

Análise morfológica dos músculos reto abdominal e estriado uretral de ratas prenhes diabéticas submetidas a exercício em ambiente aquático

Data da reunião do CEUA que aprovou o parecer inicial: 22/09/2016

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEUA.

Prof. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge  
Orientadora

Bruna Bologna Catinelli  
Aluna

Prof. Dra. Angélica Mércia Pascon Barbosa  
Coorientadora  
Coordenadora do projeto aprovado pelo CEUA



Tatiana Cristina Segatto  
Supervisor Técnico de Seção