

CAROLINA BRAGIOLA BERCHIERI RONCHI

**Efeito da suplementação com licopeno no estresse oxidativo
decorrente da prenhez**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de doutor

Orientador: Professora Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

- 2013 -

CAROLINA BRAGIOLA BERCHIERI RONCHI

**Efeito da suplementação com licopeno no estresse oxidativo
decorrente da prenhez**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de doutor

Orientador: Professora Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

- 2013 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ronchi, Carolina Bragiola Berchieri.

Efeito da suplementação com licopeno no estresse oxidativo decorrente da
prenhez / Carolina Bragiola Berchieri Ronchi. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Ana Lucia A. Ferreira

Capes: 40501000

1. Antioxidantes - Estudos experimentais. 2. Stress oxidativo. 3. Gravidez.
4. Suplementos dietéticos. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Gestação; Licopeno; Prenhez; Ratos;
Suplementação.

Dedicatória

Ao meu amigo, companheiro, parceiro de planos e sonhos, meu amor, meu marido. Obrigada por acreditar em mim e me manter de cabeça erguida nas dificuldades, e com os pés no chão nos momentos de conquistas. Obrigada pelo seu amor, carinho, companheirismo, ensinamentos e paciência. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Amo você, hoje e para sempre.

Aos meus pais, Teresa e Angelo, por me permitirem a oportunidade de estudar, graduar e seguir na pós graduação. Agradeço por acreditarem em mim e tornarem possível a realização deste sonho, e pelo apoio e carinho. Minha eterna gratidão e meu amor.

Às minhas irmãs Camila e Natalia, pedacinhos fundamentais deste quebra-cabeça chamado vida. Vocês tornam a palavra família completa! Amo vocês.

À Ana Lúcia, não consigo encontrar uma palavra para definir meu agradecimento. Quem sabe a palavra mãe, que agrega respeito, admiração, carinho, amizade, ensinamentos e aprendizado. Obrigada por seu apoio, carinho e respeito nos últimos 4 anos, e os anos de convívio que virão pela frente! E por ter possibilitado a concretização do doutorado-sanduíche. Minha admiração por você como ser humano, que sempre veio antes da “orientação”, sua capacidade de agarrar aos problemas e dificuldades ocorridas como uma mãe, jamais me deixando desamparada. A você meu amor e respeito eternos.

À Camila “chefe”, obrigada pelo acolhimento em um momento tão delicado de adaptação, pelo seu tempo e paciência em me ensinar tudo que hoje de bancada. Obrigada por todo o socorro e ajuda nos momentos de susto! Obrigada por hoje fazer parte da minha vida pessoal, uma amiga querida, e trazer consigo Márcio e Marina.

Agradecimentos

Agradeço à Deus por ter me permitido a vida, com saúde para que eu pudesse ir em busca dos meus sonhos e realizar meus objetivos. Agradeço pela oportunidade de aprender, crescer e evoluir, e assim tentar a cada dia me tornar um ser humano melhor.

À Débora, por sua paciência e disponibilidade. Agradeço pela oportunidade, confiança e amparo!

Aos meus amigos queridos, pessoas que Deus colocou em meu caminho como anjos da guarda! Vocês que me fazem sorrir, me acalmam no choro, que me dão serenidade na impaciência, que toleram minha ausência na correria. Vocês que mesmo distantes, sabe quem são e seu lugar no meu coração.

À Giselli, o espelho que Deus colocou em meu caminho para que eu jamais me engane, que enxerga muito além! Obrigada por sua amizade sempre, e por ser presente em cada momento da minha vida.

À Priscila, pela amizade e pela paciência durante meu aprendizado! Conheci através de você a metodologia, mas descobri uma amiga para todos os momentos!

Às “filhas-irmãs” Di, Eli e Renata, por tornarem Botucatu um local para chamar de lar. Agradeço pela amizade e pelo carinho. Obrigada por terem entrado em minha vida e permanecido, mesmo com a distância.

Obrigada ao Carotenoids and Health, especialmente Kyung-Jin Yeum e Guangwen Tang pelo acolhimento e a possibilidade do estágio sanduíche.

À toda equipe do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia – LAPGO, pelo apoio, ajuda, “socorro” e paciência de vocês!!!! Obrigada.

À toda equipe do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Departamento de Patologia pela ajuda. Obrigada.

Obrigada à Paula e Natália pelo seu tempo e sua ajuda diária!!!!

Obrigada à Corina, pela colaboração e paciência!!!

À seção de pós-graduação, obrigada pela atenção em todos os momentos e por sua assistência. Obrigada!

À Ana Mengue, obrigada por sua atenção, principalmente durante o estágio-sanduíche em que sempre estive de prontidão para me ajudar!

À CAPES pelo apoio financeiro durante os 4 anos e também por ter possibilitado a realização do doutorado sanduíche por me conceder o auxílio PDEE.

Epígrafe

“Deixe que a alimentação seja o seu remédio e o remédio a sua alimentação.”

Hipócrates

Índice

I. Resumo	página 09
II. Abstract	página 11
III. Introdução.....	página 13
IV. Objetivos.....	página 21
V. Materiais e Métodos	página 22
VI. Resultados	página 30
VII. Discussão e Conclusão.....	página 37
VIII. Referências	página 48
IX. Anexo 1	página 58
X. Anexo 2	página 59
XI. Desdobramentos da Tese	página 60
XII. Anexo 3	página 61
XIII. Anexo 4	página 67
XIV. Anexo 5	página 82

Resumo

Tem sido sugerido que a gestação é um estado natural de estresse oxidativo, porém ele pode estar envolvido em algumas das complicações da gestação como redução do crescimento fetal, parto prematuro, pré-eclâmpsia e interrupção da gravidez.

Nosso objetivo foi avaliar o efeito da suplementação com antioxidante lipossolúvel, licopeno, no estresse oxidativo induzido na gestação fisiológica. O estudo foi realizado em ratas Wistar adultas (n=47 fêmeas) que foram distribuídas de forma randomizada em grupo Licopeno (L, n=27) e o grupo Controle (C, n=20). O grupo L recebeu 10 mg/Kg/peso corpóreo/dia de licopeno (tomate oleoresina) e o grupo C recebeu volume equivalente de óleo de milho, ambos via *gavage* durante aproximadamente 28 dias. Após 7 dias do início da *gavage* as fêmeas foram submetidas ao acasalamento e a prenhez foi mantida até o 21º dia (termo), quando foi realizada a laparotomia. Peso corpóreo e ingestão de dieta foram registrados semanalmente. Amostras de sangue foram obtidas no 7º dia de *gavage* e no 21º dia de prenhez para determinação do estresse oxidativo (capacidade antioxidante total - TAP, lesão oxidativa do DNA, concentração de licopeno). Glicose, perfil lipídico e proteínas totais, parâmetros do desempenho reprodutivo e do desenvolvimento perinatal foram avaliados no 21º dia de prenhez.

Nossos resultados mostraram que a suplementação com tomate oleoresina não comprometeu o ganho de peso, consumo de ração/água, desempenho reprodutivo e perfil bioquímico, e resultou em diminuição significativa da lesão oxidativa de bases púricas e pirimídicas do DNA de linfócitos periféricos no final da prenhez em relação ao pré-acasalamento (purinas oxidadas: 64,44% vs. 48,50%; pirimidinas oxidadas: 74,97% vs. 40,21%, respectivamente). A diminuição da lesão oxidativa do DNA também foi observada no grupo C, mas com ausência de diferença significativa entre

pré-acasalamento e final da prenhez. Essa diminuição não foi acompanhada pelo aumento do TAP plasmático (77,06% vs. 78,84%).

Assim, nossos resultados sugerem que a suplementação com tomate oleoresina foi acompanhada pela diminuição da lesão oxidativa de bases do DNA no final da prenhez em relação ao pré-acasalamento. Essa diminuição não foi associada a mudanças no comportamento do TAP. Os resultados também sugerem ausência de efeito da suplementação no ganho de peso, no consumo de ração-água e a ausência de toxicidade do tomate oleoresina no desempenho reprodutivo em relação à formação embrionária, aborto, peso da cria e taxa de mortalidade.

Abstract

It has been suggested that pregnancy is a state of oxidative stress, which is involved in a number of pregnancy complications such as reduced fetal growth, preterm delivery, preeclampsia and pregnancy termination.

Our aim was to study the effect of supplementation with fat-soluble antioxidant, lycopene in oxidative stress induced by physiologic pregnancy. The study was conducted in adult Wistar rats (n = 47 females) randomly distributed to groups Lycopene (L, n = 27) and control group (C, n = 20). The L group received 10 mg/kg body weight/day of lycopene (tomato oleoresin) and Group C received an equivalent volume of corn oil, both via gavage for approximately 28 days. After 7 days of gavage, females were subjected to mating and pregnancy was maintained until day 21 (term), when laparotomy was performed. Body weight and diet consumption were recorded weekly. Blood samples were obtained on day 7 of gavage and at day 21 of pregnancy for determination of oxidative stress (total antioxidant performance - TAP, oxidative DNA damage, lycopene concentration). Glucose, lipid profile and total protein, reproductive performance parameters and perinatal development were assessed at day 21 of pregnancy.

Our results showed that supplementation with tomato oleoresin did not compromise weight gain, feed/water intake, reproductive performance and biochemical profile, and resulted in a significant reduction in oxidative damage of purine and pyrimidine bases in DNA from peripheral lymphocytes at the end pregnancy as compared to those of pre-mating (oxidised purines: 64.44% vs. 48.50%; oxidised pyrimidines: 74.97% vs. 40.21%, respectively). This decrease was not accompanied by increased plasma TAP (77.06% vs. 78.84%).

Thus, our results suggest that tomato oleoresin supplementation was accompanied by a decrease in oxidative damage of DNA bases at end of pregnancy as compared to those of pre-mating. This decrease was not associated to TAP changes. The results also suggest a lack of effect of supplementation on weight gain, feed/water intake, and lack of toxicity of the tomato oleoresin on reproductive performance in relation to embryo formation, abortion, weight creates and mortality.

Introdução

A gestação é caracterizada por mudanças dinâmicas em vários órgãos resultando em aumento do consumo basal de oxigênio e mudanças no uso de substratos energéticos, tanto materno como fetal. O início da gestação corresponde a estado anabólico materno com aumento nas reservas de gordura e na sensibilidade à insulina. Os nutrientes são armazenados no início da gravidez para atender às demandas feto-placentárias e maternas do final da gestação e para a lactação. Em contraste, o fim da gestação corresponde a estado catabólico com diminuição na sensibilidade à insulina com maior resistência insulínica, que resulta em aumento da glicose materna e das concentrações de ácidos graxos livres, permitindo maior disponibilidade de substrato para crescimento fetal [1].

Existem evidências que a gravidez é um estado de elevado grau de estresse oxidativo, tanto em animais [2] como em seres humanos [3]. Estresse oxidativo corresponde a evento resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (de oxigênio, ROS; e de nitrogênio, RNS) e a capacidade antioxidante. Tendo em vista a sua elevada habilidade em oxidar importantes componentes celulares (lipídios, proteínas, carboidratos e ácido desoxirribonucléico - DNA), o estresse oxidativo é hoje reconhecido como um dos mais frequentes mecanismos associados ao desenvolvimento de uma grande variedade de doenças [4] assim como eventos naturais, como a gestação [5, 6].

Vários são os fatores desencadeadores de estresse oxidativo durante a gestação. A placenta exerce importante influência na homeostase fetal. Rica em mitocôndria, a placenta consome 1% da taxa metabólica basal materna quando totalmente desenvolvida [7]. Paralelamente ao incremento da taxa metabólica, ocorre um aumento da ventilação minuto materna (de 35 a 50%) para alcançar o requerimento de oxigênio materno e fetal

[8-10]. Além disso, a alta demanda metabólica, decorrente da elevada necessidade de irrigação dos tecidos e de oxigênio, pode favorecer o aumento da geração de ROS [11]. Este ambiente altamente aeróbico é provavelmente o responsável primário pelo aumento do estresse oxidativo na gestação.

Ao longo da gravidez são formados lipoperóxidos que se ligam às lipoproteínas, que são transportados para outras regiões do organismo. Assim, a lesão ocorre não apenas no local onde é formada a espécie reativa, mas também à distância. Esse transporte, portanto, promove disseminação de peróxido de lipídios, o que caracteriza uma amplificação e perpetuação da lesão oxidativa [3]. Estudo mostrou aumento plasmático de lipoperóxidos no final da gestação e redução dos mesmos após o parto de mulheres jovens [12].

Tem sido também sugerido aumento do estado inflamatório durante a gestação, o que aumenta a suscetibilidade à geração de ROS [13] com consequente estresse oxidativo placentário conforme é estabelecida a circulação materna [14]. ROS e RNS associadas à inflamação são conhecidas por causar danos também ao DNA. A lesão de DNA pode afetar vários processos fisiológicos associados com a saúde da gestação. Além disso, a capacidade de reparo do DNA se apresenta reduzida em mulheres grávidas, tornando-as mais vulneráveis às toxinas ambientais e endógenas que possam levar a doenças [15].

A gestação *per se* é suscetível ao estresse oxidativo e as defesas antioxidantes podem estar alteradas em resposta a níveis elevados de espécies reativas [16], em animais [2] e também em humanos [3]. No entanto, este aumento não significa necessariamente um incremento do estresse oxidativo prolongado [5] uma vez que em animais ocorre uma série de mecanismos de defesas antioxidantes em resposta ao

aumento de ROS, reparando danos e limitando possíveis ocorrências posteriormente [17, 18].

Biomarcadores do estresse oxidativo

Diversos métodos são utilizados para avaliar a lesão oxidativa. Destacam-se as seguintes aferições individualizadas: oxidação das bases do DNA (teste do Cometa), oxidação lipídica (concentração de malondialdeído, nível de isoprostano) e oxidação de proteínas (via Carbonilação ou via Nitração).

O **teste do Cometa** é considerado marcador de lesão oxidativa das bases do DNA. Além desse teste, outros métodos são utilizados para a identificação da lesão do DNA, como o teste do micronúcleo, troca entre cromátides irmãs e o teste de aberrações cromossômicas. No entanto, estas técnicas citogenéticas apresentam limitações, pois requerem divisão celular e, às vezes, não podem ser aplicadas a populações celulares de interesse específico. Rydeberg e Johanson [19] utilizando técnicas bioquímicas foram os primeiros a quantificar diretamente as lesões do DNA em células individuais que, submetidas a condições levemente alcalinas, permitiam o parcial desenrolamento da molécula de DNA, tornando possível a visualização dos danos ao microscópio. Para aumentar a sensibilidade do teste, Ostling e Johanson [20] introduziram a técnica de microeletroforese em lâminas com células embebidas em agarose, dando origem ao teste hoje conhecido como Ensaio Cometa ou “Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)”. Neste, células embebidas em agarose são colocadas sobre uma lâmina, lisadas por detergentes e sais e o DNA liberado é submetido à eletroforese em tampão neutro. As células com danos mostram um aumento da migração do DNA em direção ao pólo positivo, o que, ao microscópio de fluorescência, após coloração com *syber green*, sugere a imagem de um cometa. Singh *et al.* [21], em 1988, e Collins *et al.*, em 1998

[22], introduziram condições alcalinas de eletroforese, que permitiram a detecção de quebras de fita única e lesões álcali-lábeis no DNA, aumentando assim, a sensibilidade do teste. O Ensaio Cometa apresenta várias vantagens que incluem: sensibilidade, possibilidade de avaliação de danos em células individuais, necessidade de amostras celulares extremamente pequenas, possibilidade de ser aplicado a qualquer população de células, necessitando apenas de células viáveis e não necessariamente de células em proliferação. Trata-se de um teste simples, de baixo custo, rápido e que pode ser utilizado para avaliação da genotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* e para avaliação do sistema de reparo do DNA.

Por outro lado, outros ensaios aferem a capacidade antioxidante individual do compartimento hidrofílico (glutathione reduzida, glutathione-peroxidase, superóxido-dismutase, catalase, ácido úrico, bilirrubina, albumina, ascorbato, flavonóides) e do lipofílico (carotenóides, alfa-tocoferol, flavonóides). Contudo, existe muita dificuldade na interpretação dos resultados originados de medidas individuais de componentes do sistema de defesa antioxidante. Esta limitação estimulou alguns pesquisadores a desenvolverem outros métodos onde é aferido o sistema de defesa antioxidante como um todo. O TRAP (antioxidantes sequestrantes de radical) [23] e o ORAC (capacidade de absorbância dos radicais de oxigênio) [24] correspondem a métodos bem conhecidos. Estes métodos utilizam geradores de radical hidrofílicos, os quais produzem radicais apenas no compartimento aquoso da amostra biológica. Contudo, toda amostra biológica é constituída tanto pelo compartimento aquoso como pelo lipídico. E, devido ao fato dos antioxidantes serem hidrossolúveis ou lipossolúveis, ambos os compartimentos devem ser monitorados quando se deseja avaliar a real **capacidade antioxidante total**. O método proposto por Aldini *et al.*, que foi utilizado no presente estudo, contempla a aferição de antioxidantes dos dois compartimentos [25]. A

capacidade antioxidante total (TAP) foi quantificada no plasma comparando a área sob a curva (area under the curve) relativa à cinética de oxidação do BODIPY em relação à suspensão do PC (fosfatidilcolina) que foi usado como uma referência de matriz lipídica [26, 27].

Defesa Antioxidante e reprodução

Os estudos que examinaram o sistema de defesa antioxidante têm mostrado resultados controversos. Recentemente foi verificada elevação na atividade antioxidante enzimática e não-enzimática durante a gestação. Apesar disso, a capacidade antioxidante total estava diminuída [28]. É relatado que a capacidade do sistema de defesa antioxidante hidrofílico [12] e lipofílico [29, 30] são progressivamente reduzidas ao longo da gestação. Por outro lado, estudo relata o desenvolvimento de um forte mecanismo de defesa contra os danos oxidativos conforme a gravidez avança [12].

Estudos em ratos mostraram que as fêmeas utilizam mecanismos para lidar com as consequências do aumento na demanda energética limitando o estresse oxidativo [31], como por exemplo, o aumento da expressão dos genes de defesa antioxidante [32]. Em vacas na lactação, apesar do aumento do fenômeno oxidativo sob influência hormonal e metabólica, a homeostase oxidativa se mantém pela eficiência nas defesas antioxidantes [33]. Em suínos, fêmeas encontram-se sob elevado estresse oxidativo sistêmico, sobretudo ao fim da gestação e também na lactação quando comparadas ao início da gravidez e não estão completamente recuperadas até o período de desmame [34].

Suplementação de antioxidantes e reprodução

Também têm sido controversos os resultados de estudos que examinaram a suplementação com antioxidantes na reprodução. Assim, a ausência de efeitos da

suplementação com antioxidantes já foi relatada. Estudo observou que ratas diabéticas prenhes suplementadas com extrato de *G.biloba*, este não alterou os parâmetros de antioxidantes nas mães e filhos, não melhorando a *performance* reprodutiva e os resultados perinatais [35]. Outros mostraram que vitaminas C e E combinadas e suplementadas durante a gestação não preveniram o risco de pré-eclampsia, perda neonatal ou fetal, crianças pequenas para idade gestacional ou parto prematuro [36].

Recente revisão abrangente não sustentou o uso de antioxidantes durante a gestação para prevenção de pré-eclampsia e outras complicações em mulheres com algum risco (baixo, moderado ou elevado) para desenvolver a doença. Ampla revisão cobriu 10 estudos clínicos, envolvendo 6533 mulheres, e analisou diversos antioxidantes. No geral, a revisão não observou redução associada aos suplementos antioxidantes em pré-eclampsia, pressão sanguínea elevada e parto prematuro. Quando os antioxidantes foram analisados separadamente, os dados foram insuficientes para esclarecer se havia ou não benefício com seu uso, exceto para vitaminas C e E. A evidência neste estudo não apoia o uso de antioxidantes para redução do risco de pré-eclampsia ou outras complicações [37]. Por outro lado, outros estudos têm mostrado que suplementação precoce com micronutrientes com baixo nível de antioxidantes durante a gestação pode reduzir o risco de pré-eclampsia [38]. Suplementação com combinação de vários nutrientes e antioxidantes (n-acetilcisteína, selênio, zinco, cobre, manganês, ferro, complexo B, ácido fólico, cálcio e vitaminas A, C e E) foi associada à melhores resultados materno e perinatal em mulheres grávidas com deficiente defesa antioxidante quando comparadas ao grupo controle. Além disso, pré-eclampsia foi menos frequente de forma significativa em mulheres que receberam a suplementação do que comparadas ao grupo controle [39]. Utilizando modelo experimental, estudo mostrou em porcos que a suplementação dietética com α -tocoferol durante a gestação

resultou em aumento de suas concentrações no leite, colostro, tecidos e plasma da cria no desmame. No mesmo estudo, foi mostrado que a combinação de α -tocoferol e vitamina C dietética aumentou a concentração total de imunoglobulinas e IgG no plasma da cria [40]. Revisão por Pinelli-Saavedra [41] sugere que suplementação dietética ou injeção de vitamina E com selênio em porcos tem efeito positivo na *performance* reprodutiva do que somente administração de vitamina E.

Estudo clínico mostrou que deficiência dietética de vitaminas A e E durante a lactação em mulheres foi correlacionada com baixos níveis destas vitaminas no leite materno [42]. De maneira semelhante, ingestão materna inadequada de vitamina A e selênio durante a lactação diminuiu significativamente a concentração destes nutrientes no leite materno [43].

O licopeno é um carotenóide sem atividade pró-vitamina A encontrado no tomate e nas frutas vermelhas. Em decorrência de seu grande número de duplas ligações conjugadas, o licopeno é considerado um dos melhores antioxidantes dentre os carotenóides. Além disso, o licopeno é considerado um dos mais potentes antioxidantes encontrados no organismo humano, apresentando 100 vezes maior potencia antioxidante do que vitaminas E e C. Outro atributo do licopeno se refere à sua altíssima capacidade em se ligar ao oxigênio *singlet* (uma ROS) [44], sendo melhor do que o β -caroteno (2 vezes) e α -tocoferol (10 vezes) [45]. Além do oxigênio *singlet* e radical peroxil [46], tem sido mostrada ocorrer uma forte interação entre o licopeno e outras espécies reativas (ROS) como o peróxido de hidrogênio [47], o qual pode induzir a geração de radical hidroxil, conhecido como importante ROS indutora de oxidação lipídica e de bases de DNA [48]. Sua proteção contra a oxidação de bases de DNA foi recentemente demonstrada em cardiomiócitos de ratos Wistar suplementados com licopeno na forma licopeno-oleoresina [49].

A suplementação com licopeno foi examinada também na gestação não fisiológica. Ashok *et al.* [50] mostraram que embora o licopeno não previna a pré-eclâmpsia em mulheres, pode diminuir complicações fetais. Isto pode ser devido a melhoramentos seletivos na circulação feto-placentária em comparação à circulação geral [51, 52].

Nosso grupo recentemente documentou o aumento do estresse oxidativo (lesão oxidativa do DNA) associado à diminuição de antioxidantes lipossolúveis no plasma durante a gestação de suínos [34]. Paralelamente, poucos estudos têm avaliado o efeito do importante antioxidante dietético, licopeno, na gestação e para o nosso conhecimento nenhum estudo avaliou o estresse oxidativo na vigência de suplementação com esse carotenóide durante a gravidez.

Frente ao exposto, nós hipotetizamos que o evento estresse oxidativo aumenta ao longo da gestação e que a suplementação com antioxidante, licopeno atenua tal evento. Assim, o presente estudo teve como objetivo estudar o efeito da suplementação com antioxidante lipossolúvel, licopeno, no estresse oxidativo induzido pela prenhez em modelo experimental com ratas.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o estresse oxidativo induzido pela gestação por meio da determinação dos níveis de lesão oxidativa do DNA e capacidade antioxidante total no sangue de ratas prenhes desprovidas de comorbidades.

Como objetivo secundário, este estudo avaliou o efeito da suplementação com o antioxidante licopeno no estresse oxidativo induzido pela gestação por meio das mesmas variáveis citadas no objetivo principal e nas repercussões materno-fetais decorrentes.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Experimentação do Departamento de Clínica Médica e do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia - FMB - UNESP - Botucatu com a devida aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA 979-2012).

Foram utilizadas 47 ratas Wistar fêmeas, adultas, virgens, e 10 machos da mesma espécie, adultos, pesando em torno de 250g, fornecidos pelo Biotério Anilab (Paulínea, SP).

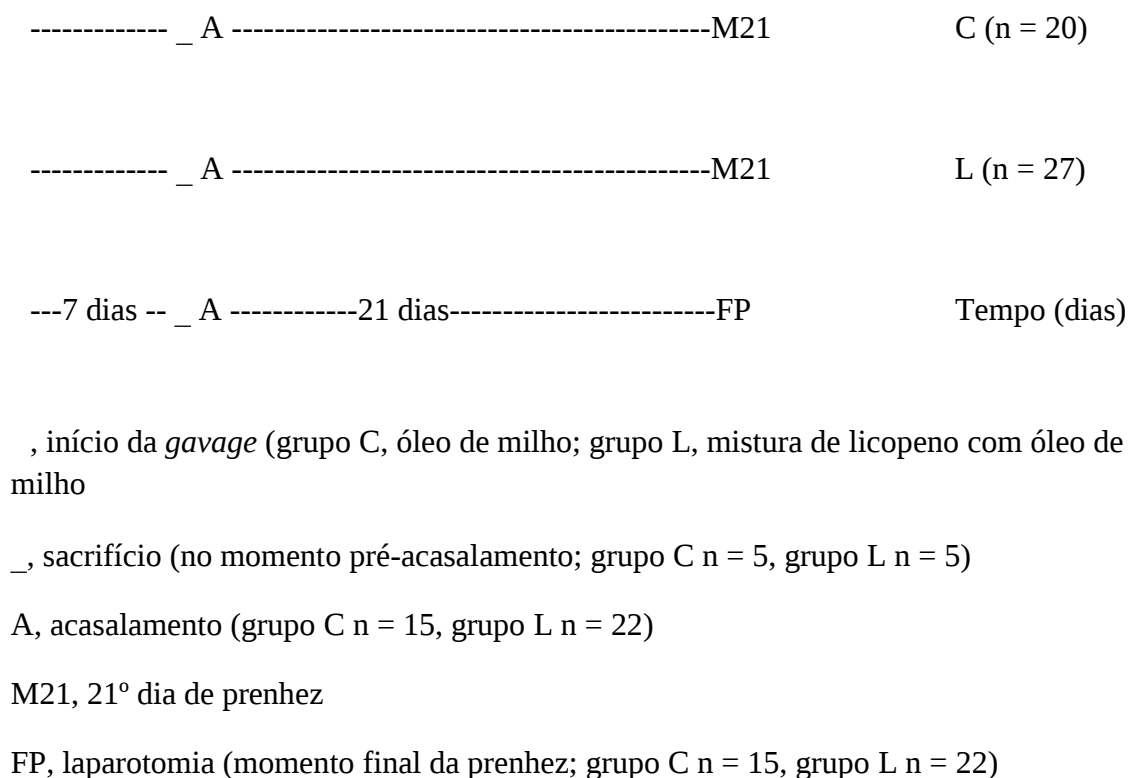
As ratas foram adaptadas no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia durante sete dias. Os animais foram mantidos (4 animais/caixa) sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h). Água filtrada e ração (Purina[®], Brasil) oferecidas *ad libitum*.

Após o período de adaptação, as fêmeas foram sorteadas para compor o grupo Controle (C, n=20) e o grupo Licopeno (L, n=27). Os animais receberam diariamente óleo de milho (C) ou suplementação de licopeno (L) via intragástrica (*gavage*) por aproximadamente 4 semanas. Os animais do grupo L receberam solução de licopeno (10mg/Kg) e os do grupo C receberam volume equivalente de óleo de milho. Os animais machos foram utilizados apenas para o acasalamento e, portanto, não receberam tratamento com licopeno/óleo.

Após 7 dias do início da *gavage*, 10 animais foram sacrificados (L, n=5; C, n= 5) para compor o grupo não prenhe e o sangue coletado. Contudo, 1 animal do grupo Controle foi excluído por motivos técnicos (sangue coagulou durante a coleta).

As fêmeas restantes foram submetidas ao acasalamento. Durante a prenhez, foram mantidas em gaiolas individuais e a *gavage* sendo administrada por mais 21 dias. A ingestão de dieta e o peso dos animais foram registrados semanalmente durante todo o período de estudo. As condições de temperatura, umidade, ciclo claro/escuro foram mantidas de maneira idêntica ao período de adaptação (Figura 1).

Figura 1. Protocolo experimental



Período de acasalamento

Após sete dias do início do estudo, as fêmeas foram submetidas ao acasalamento. No final da tarde, cada quatro ratas fêmeas e um macho foram alocados em gaiolas de polietileno até que número de réplicas fosse atingido em cada grupo experimental (C ou L). A fase de acasalamento teve a duração máxima de três dias seguidos. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e foi realizado o esfregaço

vaginal de cada rata para análise morfológica. O fator indicativo de prenhez utilizado foi a presença de espermatozoides e este considerado dia 0 de prenhez [53]. Na ausência de espermatozoides, a fêmea foi submetida ao acasalamento por no máximo mais duas tentativas.

Obtenção das amostras de plasma materno e das placentas

Amostras de sangue para a aferição das variáveis foram obtidas no momento pré-acasalamento (7º dia) quando as fêmeas foram mortas (C, n=5; L, n=5) e, no momento final da prenhez (21º dia), quando as fêmeas foram submetidas à laparotomia (C, n=9; L, n=14). A morte do momento pré-acasalamento foi realizada após jejum de 12 horas por meio de pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/Kg peso corpóreo; Hypnol[®] a 3%). A obtenção de sangue ocorreu via aspiração cardíaca.

No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico, seguido por dessangramento para coleta de sangue materno. Após a coleta de sangue, foi realizada laparotomia com exposição e retirada dos cornos uterinos para pesagem da ninhada. Em seguida, os cornos uterinos foram abertos para contagem do número de fetos vivos/mortos, sítios de implantação embrionária e de mortes embrionárias (reabsorções). Os ovários foram retirados para contagem dos corpos lúteos em estereomicroscópio como parâmetro indireto do número de ovulações. Os fetos vivos e as placentas foram pesados individualmente para cálculo do índice placentário pela relação peso placentário/peso fetal como parâmetro de avaliação de insuficiência placentária.

A classificação dos pesos corpóreos dos recém-nascidos foi realizada de acordo com a média $\pm$ desvio-padrão (DP) dos pesos corporais obtidos do grupo controle, que determinará três classes diferentes de recém-nascidos dentro dos grupos estudados:

pequeno para idade de prenhez (PIP), cujo peso foi inferior à média – 1,7 x DP; adequado para idade de prenhez (AIP), cujo peso foi compreendido entre a média $\pm$ 1,7 x DP e grande para a idade de prenhez (GIP), cujo peso foi maior que a média + 1,7 x DP [54, 55].

Procedimento do sangue coletado

O sangue coletado foi transferido para tubos contendo EDTA e livres de anticoagulante (seco). Os tubos com EDTA foram colocados nas centrífugas e, após centrifugação (2500 x g a 4°C por 10 minutos), o plasma obtido para dosagens de capacidade antioxidante total (TAP) e concentração de carotenoides. As amostras de sangue transferidas para os tubos secos foram utilizadas para aferição do lipidograma e de proteínas totais. O sangue destinado para a determinação de lesões oxidativas do DNA (ensaio Cometa) foi coletado em tubo com EDTA e imediatamente processado.

Análise de carotenoides presente na dieta

A dieta foi analisada segundo descrito previamente [56]. Para cada 10 g de dieta, 5 mL de H₂O foi adicionado e misturado por meio de movimentos giratórios durante 1 min. A solução de extração [30 mL; hexano/acetona/etanol/tolueno (50:35:30:35)] foi adicionada e misturada por 1 min, seguido por 16 horas de repouso sob luz vermelha à temperatura ambiente; 4 mL de 40% KOH metanólico e hexano (30 mL) foram adicionados e a mistura deixada no escuro à temperatura ambiente. Após 1 hora, 10% Na₂SO₄ (30 mL) foi adicionado, agitado e deixado no escuro à temperatura ambiente. Após 1 hora, a camada de hexano coletada e o volume registrado. Alíquotas de 200 µL

foram evaporadas completamente sob N₂ e o resíduo dissolvido novamente em 100 µL etanol, *vortexado* e sonicado por 30 segundos. Alíquotas de 50-µL do extrato final foram injetadas no sistema HPLC.

Análise de licopeno no plasma

Para análise do licopeno foram utilizados 400 µL de plasma, 150 µL de padrão interno (equinenona), clorofórmio/metanol CHCl₃/CH₃OH (3mL; 2:1, v/v), 500 µL de salina 8.5 g/L). Após centrifugação (3000 rpm por 10 minutos), foi coletado o sobrenadante e reservado. O hexano adicionado após a coleta do sobrenadante. As camadas clorofórmicas e hexânicas foram evaporadas sob nitrogênio e o resíduo ressuspendido em 150 µL de etanol, *vortexado* e sonicado por 30 segundos e 50µL desta alíquota foram utilizadas na análise pelo HPLC (Waters 2996 com detector de 340 nm para retinóides e 450 para carotenoides). A fase móvel utilizada foi metanol/metiltertbutiléter/ água (83:15:2, v/v/v, 15 g/L com acetato de amônio em água, solvente A) e metanol/metiltretbutiléter/água (8:90:2, v/v/v, 10 g/L com acetato de amônio em água, solvente B). O fluxo foi de 1mL/ min sendo: 1) 100% de solvente A por 2 min seguido por 6 min de gradiente linear com 70% de solvente A; 2) espera 3min depois 10 min gradiente linear com 45% solvente de A; 3) espera 2 min depois 10min de gradiente linear com 5% de solvente A; 4) espera 4 min depois 2min de gradiente linear voltando para 100% de solvente A [27]. Para a quantificação dos cromatogramas, realizamos a comparação entre as relações área da substância/área do padrão interno, obtidas na análise. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar. A aferição foi realizada em HPLC alocado no

Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp.

Determinação sérica de glicose, triglicérides, colesterol e frações, proteínas totais

Para dosagem de glicose, perfil lipídico e de proteínas, as amostras de sangue contidas em tubos secos foram mantidas a 4°C por 30 minutos e, então, submetidas à centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos a temperatura de 4°C. Foram utilizados kits colorimétricos e o aparelho Technicon RA-XT system, alocado no Laboratório Experimental de Clínica Médica. As concentrações de triglicérides, lipoproteína de alta densidade (HDL) e de colesterol total foram determinadas por método enzimático utilizando kits da marca Wiener® e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro [57, 58]. As concentrações de proteínas totais foram determinadas por método colorimétrico com o uso de espectrofotômetro, utilizando kits da marca Wiener® para todas as amostras de soro [57].

Determinação plasmática da capacidade antioxidante total (TAP)

O TAP foi realizado conforme reportado por Aldini *et al.* [25] usando um contador (Wallac Vitor 2X, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) alocado no Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando amostras de 200uL de plasma. Os resultados do método inovador TAP foram comparados ao método TAP modificado, onde foi utilizado o AAPH [2,2'-Azobis (2-amidino-propano)- dihidroclorado] como gerador de radical, o DCFH-DA [2',2'-diclorodihidrofluoresceína] diacetato como probe

e o DHS (soro humano deslipilizado) usado como uma referência de matriz hidrofílica [26].

Determinação da lesão oxidativa do DNA no sangue

Realizada pelo ensaio Cometa que avalia os danos gerais e oxidativos no DNA. Foi conduzido de acordo com a metodologia descrita previamente [21, 51, 59]. Três tipos de lesão de bases do DNA foram avaliadas (SBs, purinas oxidadas e pirimidinas oxidadas). O tipo SBs (quebras de fita simples e duplas do DNA em sítios alcali-lábeis) avalia a lesão de bases do DNA de amostras tratadas com solução tampão. O tipo SBs determina as lesões gerais desencadeadas ou não por estresse oxidativo. O tipo purinas oxidadas foi avaliada utilizando a enzima formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG), que cliva purinas oxidadas. Enquanto que para o tipo pirimidinas oxidadas, foi utilizada a enzima endonuclease III (endoIII), que detecta pirimidinas oxidadas.

Alíquotas de 10µL de sangue total foram adicionadas respectivamente a 120µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Cada uma das alíquotas foi colocada sobre lâmina previamente recoberta com camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta com lamínula e colocada a 4°C, por 5 minutos, para solidificação da agarose. Após esse período, a lamínula foi removida e a lâmina colocada em solução de lise gelada e recém preparada (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%). Após, as lâminas foram lavadas em PBS (livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) por 5 minutos. O tratamento de ambas as enzimas foi realizado em diluição 1:1000 e as lâminas permanecerão por 30 minutos em estufa a 37°C para ação da FPG e endoIII. As lâminas foram transferidas para cuba horizontal de eletroforese, que foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1mM EDTA e 300mM

NaOH, pH>13). Após período de 40 minutos para desespiralização do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis, a eletroforese foi conduzida a 25V por 30 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas por 15 minutos em solução de neutralização (0,4M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto, secas à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50µl de solução de syber Green (20µg/mL), cobertas com lamínulas, e os nucleóides visualizados em microscópio de fluorescência (aumento de 400X) acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay II – Perceptive Instruments*, UK). O teste foi realizado em duplicata, com lâminas codificadas e analisadas em teste cego, utilizando-se o parâmetro “tail intensity” (% de DNA na cauda).

Linfócito periférico de sangue de rato do grupo controle foi usado como controle positivo (tratado com H₂O₂ 100 uM) e controle negativo (não tratado).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando SigmaStat versão 2.0 para Windows 95, NT & 3.1 (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, EUA). As comparações foram realizadas pelo teste T de *Student*. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais aplicados nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (Protocolo CEEA 979-2012, Anexo 2).

Resultados

Avaliação de Licopeno

Dieta – Não foi detectado licopeno ou α -tocoferol na dieta, mas os níveis de luteína e zeaxantina foram 4 e 2 mg por Kg de dieta, respectivamente.

Solução de suplementação com licopeno – Da solução preparada com tomate oleoresina e óleo de milho, os animais do grupo licopeno receberam via intragástrica (*gavage*) por 0,77, 2,02 e 9,955 mg/kg de peso corpóreo/dia de 13-*cis*- β -caroteno, todo-*trans*- β -caroteno e licopeno-total, respectivamente. A aferição do licopeno por HPLC confirmou que cada 2 mL da solução continha aproximadamente 10 mg de licopeno total (todo *trans* - licopeno + isômeros *cis* – licopeno). A concentração de licopeno foi também checada por espectrofotometria fixando-se o comprimento de onda em 450nm (ANEXO 1). O licopeno na solução de óleo de milho permaneceu estável por no mínimo 9 semanas a 4°C. A solução foi aquecida por 20 minutos em banho-maria a 54°C antes de ser oferecida via *gavage* aos animais.

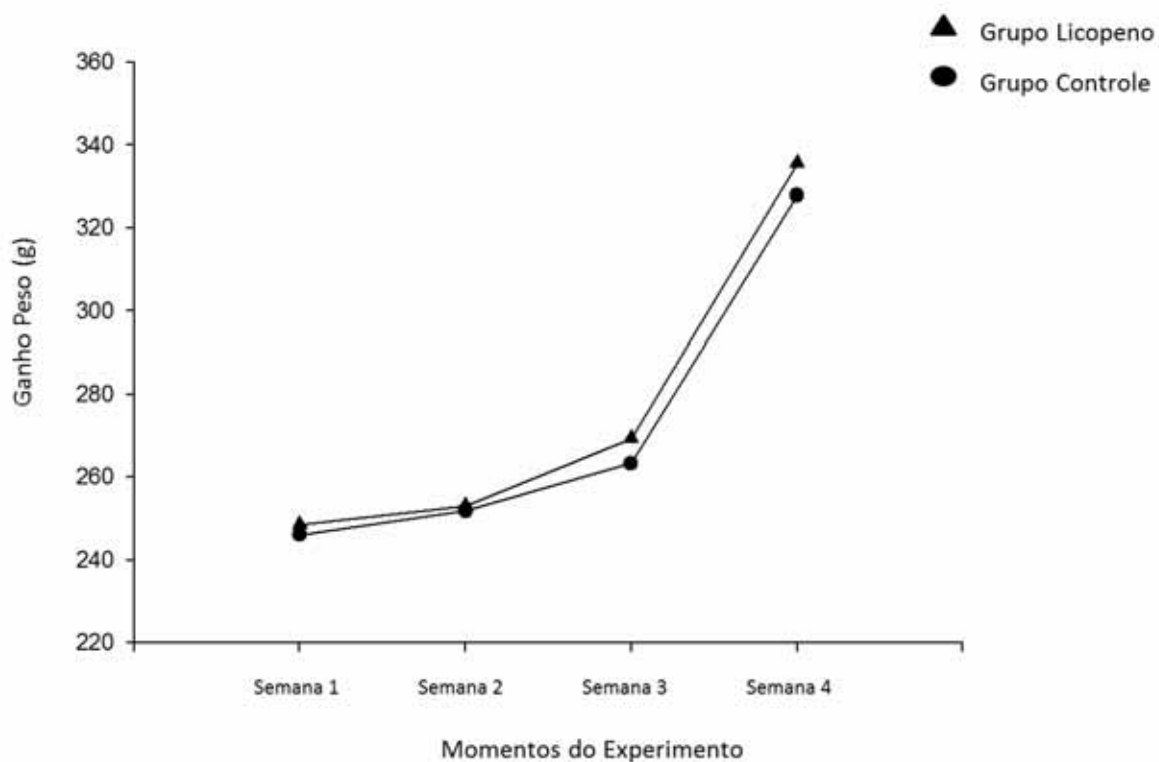
Plasma – As ratas do grupo controle não apresentaram licopeno detectável tanto no grupo não prenhe como nos animais prenhes. Isso ocorreu devido à ausência de licopeno na dieta. Após 7 (não prenhe) ou 21 dias (prenhe) de suplementação com tomate-oleoresina, a concentração plasmática alcançou níveis muito baixos ($0,119 \times 10^{-8}$ a $6,610 \times 10^{-8}$ nMol/L) ou indetectáveis de licopeno. Não foi possível identificar produtos de um possível metabolismo de licopeno nas amostras.

Efeito da suplementação com licopeno no Peso corpóreo e consumo de ração e de água

Os animais foram pesados nas semanas 1, 2, 3 e 4 do experimento (Figura 2). Ambos os grupos, Controle e Licopeno mostraram ganho de peso gradual, com aumento

de peso importante da 3^a para 4^a semana, que marca o final da prenhez próximo ao momento do parto. Não houve diferença de peso corpóreo entre os grupos em todos os momentos de aferição, indicando a ausência de efeito da suplementação de licopeno no peso corpóreo dos animais.

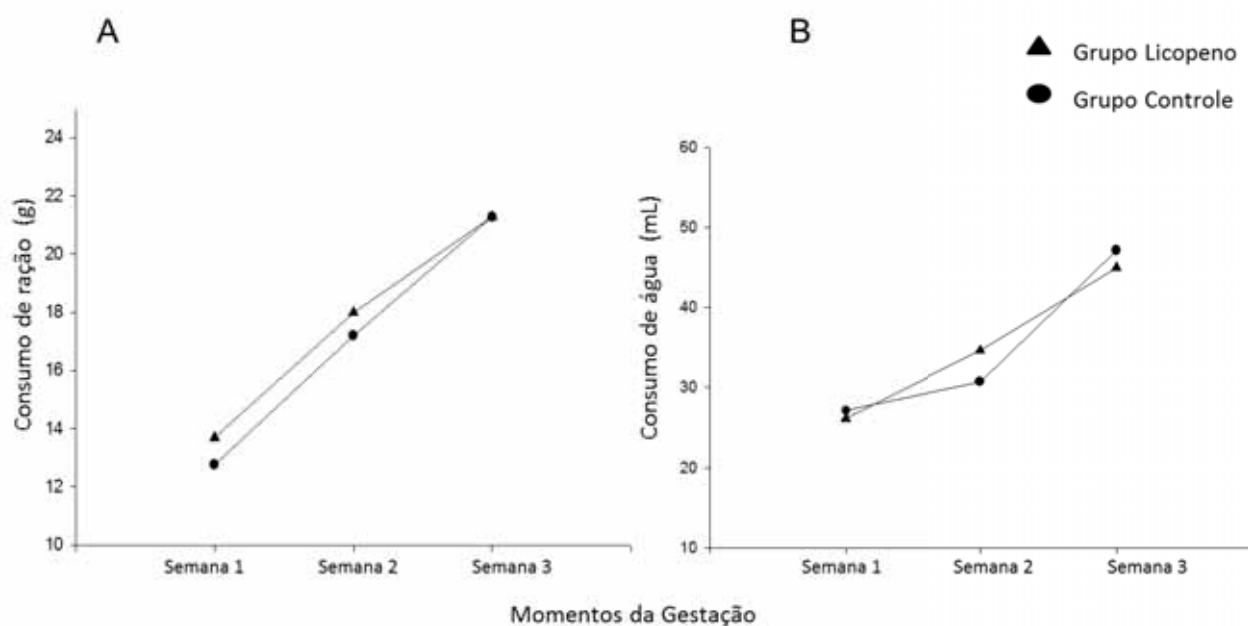
Figura 2. Ganho de peso corpóreo (g) durante o experimento



O consumo de ração (Figura 3A) e de água (Figura 3B) foi mensurado a partir do momento de diagnóstico de prenhez, por três semanas consecutivas. O grupo Controle e o grupo Licopeno apresentaram aumento gradativo no consumo de ração e água de acordo com o aumento da idade gestacional. Não houve diferença entre os

grupos em todos os momentos de aferição, indicando a ausência de efeito da suplementação de licopeno no consumo de ração e de água dos animais.

Figura 3. Consumo de ração (g) e água (mL) durante a prenhez.



Efeito da suplementação com licopeno na performance reprodutiva

A tabela 1 ilustra a *performance* reprodutiva das ratas prenhes. A comparação entre os grupos Controle e Licopeno não mostrou diferença em relação a todas variáveis estudadas. Esse resultado indica que a suplementação com licopeno não interferiu na *performance* reprodutiva materna e nos embriões.

Tabela 1. Performance reprodutiva materna de ratas prenhes suplementadas ou não com tomate oleoresina (licopeno, 10 mg/Kg p.c./dia)

	Controle (n =7)	Licopeno (n =13)	P *
Número de corpos lúteos	12,42 ± 1,98	12,76 ± 1,69	> 0,05
Número de implantações	12,28 ± 1,79	11,61 ± 3,79	> 0,05
Número de fetos vivos	11,28 ± 1,38	11,30 ± 3,86	> 0,05
Reabsorções	1,00 ± 1,41	0,30 ± 0,85	> 0,05
Peso ninhada (g)	42,95 ± 8,65	45,43 ± 14,30	> 0,05
Perda pré-implantação (%)	0,95 ± 2,51	13,02 ± 24,38	> 0,05
Perda pós-implantação (%)	7,29 ± 10,01	3,46 ± 8,51	> 0,05

Valores apresentados como média ± desvio padrão (SD);

n, amostra; animais suplementados com óleo ou licopeno por 21 dias;

*, teste t de *Student* usado para comparar grupo Controle e Licopeno.

Efeito da suplementação com licopeno no perfil bioquímico ao final da prenhez

A Tabela 2 mostra ausência de efeito da suplementação com licopeno no perfil bioquímico ao final da prenhez.

Tabela 2. Perfil Bioquímico, ao final da prenhez, de ratas suplementadas ou não com tomate oleoresina (licopeno, 10 mg/Kg p.c./d)

	Controle	Licopeno	P *
Colesterol Total	59,71 ± 9,92 ⁽⁷⁾	55,07 ± 8,89 ⁽¹³⁾	> 0,05
HDL-colesterol	22,71 ± 4,64 ⁽⁷⁾	19,07 ± 3,47 ⁽¹³⁾	> 0,05
Triglicerídeos	237,14 ± 61,13 ⁽⁷⁾	296,92 ± 117,99 ⁽¹³⁾	> 0,05
Glicose	83,57 ± 9,03 ⁽⁷⁾	82,15 ± 6,90 ⁽¹³⁾	> 0,05
Proteínas Totais	4,91 ± 0,42 ⁽⁷⁾	4,56 ± 0,47 ⁽¹³⁾	> 0,05

Valores apresentados como média ± desvio padrão (SD);

n, amostra; animais suplementados com óleo ou licopeno por 21 dias;

*, teste t de *Student* usado para comparar grupo Controle e Licopeno.

Efeito da suplementação com licopeno na capacidade antioxidante total plasmática

Os resultados referentes à capacidade antioxidante total (TAP) mostraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre os estados prenhe e não prenhe (Tabela 3). Esse comportamento foi observado tanto no grupo Controle como no grupo Licopeno, embora possa ser observada discreta diminuição (prenhe versus não prenhe, $P > 0,05$) da proteção nos animais prenhes do grupo Controle. Quando comparamos os grupos dentro do mesmo estado (prenhe e não prenhe) também não foi verificada diferença entre os grupos (não prenhe: Controle = Licopeno; prenhe: Controle = Licopeno). Os resultados indicam que tanto a prenhez como a suplementação com licopeno não alteraram o valor da TAP.

Tabela 3. Capacidade antioxidante total plasmática, ao final da prenhez, de ratas suplementadas ou não com tomate oleoresina (licopeno, 10 mg/Kg p.c./dia)

	Não prenhe	Prenhe	P^1
Controle ⁽ⁿ⁾	79,91 ± 1,91 ⁽⁴⁾	76,68 ± 3,72 ⁽⁷⁾	> 0,05
Licopeno ⁽ⁿ⁾	77,06 ± 3,58 ⁽⁵⁾	78,84 ± 5,79 ⁽¹³⁾	> 0,05
P^2	> 0,05	> 0,05	

Valores apresentados como média ± desvio-padrão (SD);

n, amostra; não prenhe, animais suplementados com óleo ou licopeno por 7 dias; prenhe, animais suplementados com óleo ou licopeno por 21 dias;

^{1, 2} teste t de *Student* foi usado para comparar não prenhe versus prenhe (P^1) e para comparar grupos Controle versus Licopeno (P^2).

Efeito da suplementação com licopeno na lesão de bases do DNA de linfócitos de sangue periférico

A lesão de DNA (incluindo SBs, purinas oxidadas e pirimidinas oxidadas) foi detectada pelo teste alcalino Cometa modificado com enzimas FPG e endo III que,

detectam especificamente purinas oxidadas e pirimidinas oxidadas, respectivamente (Tabela 4).

Os resultados referentes à lesão do tipo SBs mostraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre os estados prenhe e não prenhe. Esse comportamento foi observado tanto no grupo Controle (prenhe = não prenhe) como no grupo Licopeno (prenhe = não prenhe). Quando comparamos os grupos dentro do mesmo estado, também verificamos ausência de diferença entre os grupos tanto para o estado prenhe (Controle = Licopeno) como para o não prenhe (Controle = Licopeno).

Com relação à lesão do tipo purinas oxidadas, foi observado em ambos os grupos uma diminuição nas ratas prenhe em relação às não prenhe, mas com diferença significativa ($P = 0,047$) apenas no grupo Licopeno (Licopeno: prenhe < não prenhe). Quando comparamos os grupos dentro do mesmo estado, verificamos ausência de diferença entre os grupos tanto para o estado prenhe (Controle = Licopeno) como para o não prenhe (Controle = Licopeno).

Com relação à lesão do tipo pirimidinas oxidadas, foi observado em ambos os grupos uma diminuição no grupo prenhe em relação ao não prenhe, mas com diferença significativa ($P < 0,001$) apenas no grupo Licopeno (Licopeno: prenhe < não prenhe). Quando comparamos os grupos dentro do mesmo estado, verificamos ausência de diferença entre os grupos tanto para o estado prenhe (Controle = Licopeno) como para o não prenhe (Controle = Licopeno).

Outro resultado relevante foi que o tomate oleoresina não induziu qualquer tipo de lesão de DNA em linfócitos periféricos de ratas prenhes ou não.

Tabela 4. Danos no DNA (*tail intensity*) de linfócitos de sangue periférico de ratas suplementadas ou não com tomate oleoresina (licopeno, 10 mg/Kg p.c./dia).

		Não Prenhe	Prenhe	P^1
Controle ⁽ⁿ⁾	SBs	58,75 ± 8,80 ⁽⁴⁾	48,10 ± 15,66 ⁽⁵⁾	> 0,05
Licopeno ⁽ⁿ⁾	SBs	54,19 ± 10,23 ⁽⁵⁾	49,01 ± 20,95 ⁽¹²⁾	> 0,05
P^2		> 0,05	> 0,05	
Controle ⁽ⁿ⁾	Purinas	66,82 ± 6,14 ⁽⁴⁾	53,51 ± 18,83 ⁽⁵⁾	> 0,05
	Oxidadas			
Licopeno ⁽ⁿ⁾	Purinas	64,44 ± 8,86 ⁽⁵⁾	48,50 ± 15,26 ⁽¹²⁾	0,047
	Oxidadas			
P^2		> 0,05	> 0,05	
Controle ⁽ⁿ⁾	Pirimidinas	65,17 ± 29,23 ⁽⁴⁾	47,98 ± 23,17 ⁽⁵⁾	> 0,05
	Oxidadas			
Licopeno ⁽ⁿ⁾	Pirimidinas	74,97 ± 8,39 ⁽⁵⁾	40,21 ± 13,79 ⁽¹²⁾	< 0,001
	Oxidadas			
P^2		> 0,05	> 0,05	

Valores correspondem a *Tail intensity* (% de DNA na cauda) e são apresentados como média ± desvio-padrão (SD);

n, amostra; SBs, quebras de fita simples e duplas do DNA e sítios alcali-lábeis; não prenhe, animais suplementados com licopeno por 7 dias; prenhe, animais suplementados com licopeno por 21 dias;

Teste t de *Student* foi usado para comparar não prenhe versus prenhe (P^1) e para comparar grupos Controle versus Licopeno (P^2)

Discussão

Existem evidências que a gestação é um estado de elevado grau de estresse oxidativo, tanto em animais [2] como em seres humanos [3]. Alguns estudos têm examinado o efeito da suplementação com antioxidantes nas complicações da gravidez [38, 39, 50].

Nosso grupo recentemente documentou o aumento do estresse oxidativo (lesão oxidativa do DNA) associado à diminuição de antioxidantes lipossolúveis no plasma durante a prenhez em modelo animal com suínos [34]. Paralelamente, poucos estudos têm avaliado o efeito de antioxidantes na gestação sem complicações [40, 41] e para o nosso conhecimento nenhum estudo examinou o estresse oxidativo após a suplementação com o antioxidante lipossolúvel, licopeno.

No presente estudo nós utilizamos licopeno na forma tomate oleoresina. A dose de licopeno (10 mg/Kg p.c./dia) foi selecionada com base em prévios estudos [60, 61] e foi administrada antes do acasalamento (por 7 dias) e durante a prenhez (por 21 dias). Dessa forma, a administração foi contínua por um período total de 28 dias.

Ganho de Peso/ Consumo

Em nosso estudo, ratas prenhes se comportaram de forma semelhante em ambos os grupos, recebendo suplementação ou não, em relação ao ganho de peso, consumo de ração e de água. Esses resultados indicam que a suplementação com licopeno não comprometeu essas variáveis. Poucos estudos verificaram o efeito de suplementos no ganho de peso assim como no consumo alimentar e hídrico. Utilizando ratos como modelo experimental, Sánchez *et al.* (2008) verificaram ação benéfica da suplementação precoce (a partir da lactação) com leptina desde que os animais apresentaram menor

peso na vida adulta, menor consumo de calorias e baixa preferência por alimentos ricos em gorduras do que seus controles [62].

Performance reprodutiva

O antioxidante licopeno não interferiu na *performance* reprodutiva dos animais nem em seus embriões. Esses resultados sugerem a ausência de toxicidade do licopeno no desempenho reprodutivo em relação à formação embrionária, aborto, peso da cria e taxa de mortalidade.

Até o presente momento não encontramos trabalhos que utilizaram licopeno durante a gestação em modelos experimentais objetivando verificar seu efeito em termos de toxicidade na *performance* reprodutiva. Prévio estudo clínico avaliou o efeito da suplementação oral com licopeno (2mg/ 2 vezes ao dia) em mulheres primigestas no segundo trimestre de gestação. Os autores observaram que, em relação ao grupo placebo, o grupo que recebeu licopeno apresentou menor incidência de pré-eclampsia, menor pressão diastólica, maior média de peso fetal, assim como menor retardo no crescimento intrauterino [52]. Outro estudo clínico também identificou que mulheres gestantes que receberam suplementação de licopeno (2mg/ 2 vezes ao dia) apresentaram significativa redução na incidência de bebês com retardo no crescimento e melhor resultado perinatal, comparadas àquelas que não receberam suplementação [50].

Existem na literatura trabalhos experimentais e clínicos que examinaram outros suplementos em gestação sem ou com comorbidades.

Estudo experimental buscou avaliar o efeito compensatório de antioxidantes (vitaminas C e E) associados ao implante de progesterona exógena, utilizada em protocolos de sincronização de estro em fêmeas bovinas. Neste estudo a utilização de vitamina E apresentou efeito positivo na reprodução, apresentando maior taxa de prenhez nos animais suplementados [63]. Estudo clínico, no qual mulheres grávidas

receberam diferente suplementação (ácido fólico, ácido fólico + ferro, ácido fólico + ferro + zinco ou múltiplos micronutrientes + vitamina A, vitamina A) observou que suplementação com ácido fólico + ferro aumentou o peso ao nascer em 37g e diminuiu a incidência de bebês com baixo peso ao nascer em 34%. Suplementação de múltiplos micronutrientes aumentou o peso ao nascer em 64g e diminuiu a incidência de bebês baixo peso ao nascer em 14%. Nenhuma das combinações de suplementação reduziu a incidência de nascimento pré-termo, Ácido fólico + ferro e múltiplos micronutrientes aumentaram a circunferência cefálica e de tórax, porém não o comprimento [64]. Por outro lado, estudo clínico com gestantes observou que a administração semanal (a partir do primeiro trimestre até 12 semanas pós-parto) de vitamina A (7000 µg na forma de retinil palmitato) ou de beta-caroteno (42mg) ou placebo não reduziu a taxa de risco/mortalidade fetal, materna e infantil [65].

Outros estudos avaliaram o efeito da suplementação na gestação não fisiológica. Estudo não observou benefícios do tratamento com *G,biloba* (200 mg/kg/dia durante a gestação) em ratas prenhes portadoras de diabetes materno grave (glicemia superior a 200 mg/dL). Em detalhe, o tratamento com *G,biloba* não melhorou parâmetros reprodutivos (número de corpos lúteos, de implantações, de fetos vivos, número de reabsorções embrionárias e da porcentagem de perda pós-implantação, incidência de recém-nascidos apresentando restrição de crescimento, malformações) [66]. Por outro lado, outro relato mostrou que ratas portadoras de diabetes induzido e suplementadas com vitamina E (150 mg/d via oral) apresentaram redução da taxa de má formação e aumento do tamanho e maturação dos embriões [67]. Ainda em diabetes induzido, o benefício da suplementação com a mesma vitamina (150 mg/d via oral) foi demonstrado pela melhora de má formações (12%) nas ratas suplementadas em relação às não suplementadas (44%) [68]. Em estudo com ratas prenhes suplementadas com ácido

linolênico e γ -linolênico, o tratamento com γ -linolênico nas ratas diabéticas (glicemia > 300mg/dL vs. 100mg/dL grupo controle) piorou o desempenho reprodutivo materno (número reduzido de fetos nascidos vivos e implantações), contudo a suplementação protegeu o dano à incidência de anomalias congênitas provocadas pela hiperglicemia [69].

Estudo clínico avaliou mulheres com risco para pré-eclampsia e suplementação com vitaminas C (1000 mg) e E (400 IU) ou placebo diariamente do segundo trimestre de gestação até o parto. Os autores observaram que a incidência de pré-eclampsia foi semelhante entre grupos. Maior número de crianças com baixo peso foi identificado nas mulheres que fizeram uso de antioxidantes do que nas do grupo controle, indicando que o uso de antioxidantes não resultou em efeito protetor em relação à pré-eclâmpsia nem em relação ao peso ao nascer [35]. Da mesma forma, outro trabalho concluiu que o uso de vitaminas C e E como suplemento durante a gestação não reduz o risco para pré-eclampsia, perda fetal ou neonatal, crianças com menor tamanho para idade gestacional ou parto prematuro [36].

Bioquímicos

Em nosso trabalho, observamos valores elevados de triglicerídeos em ambos os grupos de ratas prenhes. Esse achado também foi descrito por Desoye *et al.* (1987). Os autores observaram que durante a gestação, mulheres normais apresentaram aumento dos níveis de triglicerídeos plasmáticos sendo que seu pico máximo ocorreu na metade do terceiro trimestre, alcançando valores até cinco vezes maiores do que os valores basais [70]. Isso se deve em parte ao aumento dos níveis de estrogênio e prolactina, que acarretariam maior produção hepática de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (VLDL) e ao efeito lipolítico do hormônio lactogênico placentário sobre o tecido adiposo [70, 71].

Não encontramos na literatura relatos sobre a influência do licopeno nos parâmetros bioquímicos tanto em humanos como em animais.

Utilizando suco de acerola (rico em vitamina C), Barbalho *et al.* (2011) trataram filhotes de ratas diabéticas ou não diabéticas. Os filhotes das ratas não diabéticas (não tratados e tratados, respectivamente) apresentaram níveis de glicose (67 e 68mg/dL), triglicerídeos (119 e 83 mg/dL), colesterol (76 e 98 mg/dL) semelhantes, enquanto os níveis de HDL-colesterol foram significativamente maiores no grupo tratado (34 e 45 mg/dL) [72]. Em trabalho realizado utilizando ratos machos Wistar tratados com *P. edulis* (maracujá/ 1,000 mg/kg/28 dias) apresentaram aumento nas lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol) e diminuição nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e também nos ácidos graxos. Houve também menor peroxidação lipídica no grupo tratado, mostrando efeito protetor [73].

Concentrações de licopeno plasmático

No presente estudo, nós utilizamos suplementação com licopeno na dose de 10 mg/Kg peso/dia sendo que o grupo não prenhe recebeu tal dose por 7 dias e o grupo prenhe, por 21 dias. O licopeno total apresentado representa o isômero todo *trans*. Os resultados do presente estudo mostraram que o licopeno plasmático atingiu níveis muito baixos ($0,119 \times 10^{-8}$ a $6,610 \times 10^{-8}$ nMol/L) ou indetectáveis do carotenóide após 7 ou 21 dias de suplementação.

Usando a mesma dose de licopeno que o presente estudo, nosso grupo mostrou que ratos machos Wistar desprovidos de comorbidades atingiram maiores níveis (média $\pm$ DP) de licopeno total plasmático ($22,9 \pm 19,1$ nMol/L) após 6 semanas de suplementação [74]. Usando dose menor de licopeno (5 mg/Kg peso/dia), outro estudo publicado por nosso grupo mostrou que os níveis plasmáticos também atingiram

maiores valores ($4,69 \pm 2,35$ nMol/L) após 7 semanas de suplementação em ratos machos Wistar desprovidos de comorbidades [75].

Nós não identificamos isômeros *cis* de licopeno. Ratos machos de outra linhagem (F344) alcançaram níveis plasmáticos (média $\pm$ Erro Padrão, nMol/L) de 22,4 de licopeno total (total *cis*: $16,8 \pm 7,5$; todo *trans*: $7,5 \pm 3,7$) após suplementação com 5mg/Kg peso/dia por 9 semanas [56].

A aparente ausência de licopeno observada no presente estudo pode em parte ser explicada pela possível ocorrência de metabolismo aumentado desse carotenóide em fêmeas [76]. O aumento do metabolismo do licopeno em células intestinais dos animais resultaria no desaparecimento do licopeno habitualmente visualizado no sistema HPLC (formas convencionais todo-*trans*-licopeno ou *cis*-licopeno) [27]. Essa possibilidade poderia ser confirmada pela identificação de metabólitos desse carotenóide, por meio de espectrometria de massa, se tivéssemos usado licopeno marcado com deutério ($^2\text{H}_{10}$ -licopeno) na solução de suplementação. Vale a pena ser destacado que a ocorrência do metabolismo do licopeno não necessariamente inativa propriedades antioxidantes desse carotenoide [77].

Lesão de DNA

A gestação não foi associada ao aumento de lesão de DNA aferido em linfócitos de sangue periférico. Essa afirmação pode ser confirmada pela ausência de elevação de níveis das lesões nas ratas prenhes (momento final da prenhez) em relação às não prenhes (momento pré-acasalameto) de ambos os grupos. Ao contrário, foi observada diminuição de lesão oxidativa de bases (púricas, $P = 0,047$ e pirimídicas, $P < 0,001$) do DNA ao final da prenhez em comparação com os animais não prenhe do grupo Licopeno. O mesmo comportamento foi observado no grupo Controle, porém a

comparação entre animais prenhe e não prenhe não atingiu níveis significantes. A diminuição de lesão oxidativa observada no final da prenhez pode estar associada ao conhecido aumento de antioxidantes placentários que ocorre no fim da gestação.

Conhecida como fonte de antioxidantes, a placenta mostra aumento progressivo de expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, Cu/ZnSOD) de acordo com a idade gestacional [78]. Além do baixo estado de antioxidantes no início da gestação (anterior ao fim do primeiro trimestre), a placenta se comporta como um ambiente hipóxico com tensão de oxigênio intrauterino extremamente baixa ($pO_2 < 20$ mmHg, $\sim 5\%$ O_2) na oitava semana [14], condição que pode levar a aumento na geração de espécies reativas de oxigênio [79].

O fato de não termos observado aumento de lesão de DNA nas ratas prenhes pode ser em parte explicado pelo fato de que coletamos sangue em apenas um momento (no fim da prenhez). É provável que o início da prenhez seja caracterizado pelo alto nível de lesão a qual progressivamente é atenuada pelos antioxidantes originados da placenta. Se tivéssemos coletado sangue em vários momentos durante a prenhez provavelmente iríamos observar uma diminuição progressiva das lesões oxidativas.

Outro resultado relevante foi que o tomate oleoresina não induziu qualquer tipo de lesão de DNA em linfócitos periféricos de ratas prenhes ou não.

Embora não tenhamos examinado a capacidade de reparo do DNA, prévio estudo mostrou que a suplementação com outro antioxidante (vitamina E, 150 mg/d, via gavagem) em ratas prenhes portadoras de diabetes induzido resultou em diminuição de níveis totais de adutos de DNA em 17% no fígado materno e em 25% nos embriões, em relação aos animais não suplementados [68]. Esse resultado sugere que a suplementação com esse antioxidante pode melhorar o reparo do DNA em diabetes, evento associado à dificuldade no reparo do DNA.

TAP

A melhora da lesão oxidativa do DNA não se associou ao comportamento verificado na TAP. As alterações de lesão de DNA provavelmente foram insuficientes para interferirem no sistema de defesa antioxidante. A estabilidade no sistema antioxidante pode em parte estar associada ao aumento na regulação dos genes antioxidantes. Tem sido sugerido que animais frequentemente adequam um conjunto de defesas antioxidantes em resposta ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, reparando danos e limitando subsequente ocorrência [17, 18]. De fato, a placenta está protegida do estresse oxidativo pelo aumento da expressão dos genes de defesa antioxidante [32]. Examinando o papel da peroxiredoxina III (enzima antioxidante) na defesa antioxidante na placenta de ratas, estudo evidenciou que esta enzima desempenhou papel crucial na defesa antioxidante placentária, concluindo que a regulação da peroxiredoxina III pode fornecer certa compensação que protegeu eritrócitos contra lesão oxidativa [80].

Prévios estudos examinaram o comportamento de componentes do sistema de defesa antioxidante em gestação não fisiológica. O comprometimento da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi identificado em plasma e sangue coletado do cordão umbilical das mulheres portadoras de diabetes gestacional, em relação ao grupo controle [81]. Níveis de selênio e de glutathione peroxidase avaliados em diferentes grupos de mulheres (gestantes, não gestantes, gestantes que apresentaram aborto espontâneo) mostraram-se diminuídos de maneira significativa nas que sofreram aborto. A glutathione peroxidase também foi significativamente menor em mulheres gestantes do que nas não grávidas [82]. Avaliando a atividade da enzima catalase sanguínea em mulheres (gestantes, não gestantes e grávidas com diabetes gestacional), Goth *et al.* mostraram diminuída atividade da enzima nas gestantes quando comparadas ao grupo controle (89 vs 109 MU/L, respectivamente), e ainda menor naquelas com diabetes gestacional (74

MU/L) [83]. Outro estudo que também avaliou mulheres grávidas (com e sem diabetes gestacional) mostrou maiores níveis de ácido ascórbico, atividade da enzima catalase e níveis plasmáticos de vitamina E nas mulheres sem diabetes gestacional (ácido ascórbico: 6.17 vs 4.75mg/dL; catalase: 11.58 vs 10.75U/g Hb; vitamina E: 9.23 vs 7.87μMol/L). O mesmo estudo ainda mostrou que os níveis de SOD e glutathione peroxidase foram menores do que nas gestantes com diabetes gestacional (392.66 vs 419.82U/g Hb; 68.66 vs 73.74U/g Hb) [84]. Por outro lado, outro estudo mostrou não haver comprometimento dos níveis de glutathione peroxidase (durante os três trimestres da gestação) em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, em relação ao grupo controle [85].

Embora tenhamos adotado modelo de gestação fisiológica, outro trabalho também mostrou ausência de benefício de suplementação com antioxidante em alguns componentes do sistema de defesa antioxidante. De fato, utilizando modelo de diabetes induzido (glicemia superior a 200 mg/dL), não foi identificado melhora com suplementação com *G.biloba* (200 mg/kg/dia durante a gestação) em ratas prenhes portadoras de deficiência da atividade hepática da glutathione peroxidase e dos níveis hepáticos de glutathione total. Em detalhe, o tratamento com *G.biloba* não melhorou a atividade hepática da catalase e dos níveis hepáticos de glutathione total tanto maternos como fetais [66].

Considerações finais

Nossos resultados mostraram que a suplementação com tomate oleoresina (licopeno, 10 mg/Kg p.c./dia) oferecida previamente ao acasalamento e durante a prenhez fisiológica de ratas Wistar não comprometeu o ganho de peso, consumo de ração/água, desempenho reprodutivo e perfil bioquímico. Por outro lado, a

suplementação com licopeno resultou em diminuição significativa da lesão oxidativa (de bases púricas e pirimídicas) do DNA de linfócitos periféricos no final da gestação em relação ao pré-acasalamento. Essa diminuição não foi acompanhada pelo aumento da TAP plasmática, indicando que as lesões oxidativas do DNA não foram suficientes para comprometer o sistema de defesa antioxidante.

Embora tenhamos observado efeito benéfico do licopeno nas lesões oxidativas de bases do DNA, deve ser enfatizado que existem outras substâncias antioxidantes presentes no tomate oleoresina (γ -tocoferol, α -tocoferol, β -caroteno, fitoflueno, e fitoeno) [86] que podem contribuir para explicar os resultados do presente estudo. Adicionais pesquisas usando licopeno puro poderão colaborar para confirmar se o efeito protetor é exclusivo do licopeno.

O presente estudo apresenta algumas limitações tais como: 1) baixa amostra no momento pré-acasalamento: a decisão em selecionar poucos animais para o sacrifício no pré-acasalamento foi tomada baseada na dificuldade de sucesso de prenhez. Nós preferimos correr o risco da baixa amostra na fase pré-acasalamento do que correremos o risco de ter poucos animais na fase prenhe; 2) pequeno número de coletas de sangue durante a gestação: de fato, poderíamos amplificar o número de coletas, contudo essa decisão foi tomada com o objetivo de evitar o risco de exagerada manipulação dos animais e consequente estresse físico dos mesmos; e 3) identificação de baixos níveis de licopeno plasmático: o baixo nível de licopeno plasmático observado não invalida os resultados do presente estudo uma vez que é descrito o desaparecimento dos isômeros de licopeno, convencionalmente visualizados pelo sistema HPLC, frente à possível decorrência do metabolismo do licopeno nas células intestinais.

Em conclusão, os resultados sugerem que o final da gestação foi caracterizado por diminuição da lesão oxidativa de bases do DNA em relação à fase de pré-

acasalamento. Essa observação foi significativa apenas no grupo suplementado com tomate oleoresina. As alterações na lesão do DNA observadas não interferiram no comportamento da TAP. Os resultados também sugerem a ausência de efeito da suplementação no ganho de peso e no consumo de ração-água e a ausência de toxicidade do tomate oleoresina no desempenho reprodutivo em relação à formação embrionária, aborto, peso da cria e taxa de mortalidade.

Embora o desenho experimental possa simular situações clínicas gestacionais, seria imprudente extrapolar os presentes resultados para humanos. Entretanto, o presente estudo representa uma contribuição para o entendimento das alterações da gestação fisiológica e para o conhecimento dos efeitos da suplementação com licopeno (tomate oleoresina) no estresse oxidativo materno e *performance* reprodutiva.

Referências

1. Lain, K.Y. and P.M. Catalano, *Metabolic changes in pregnancy*. Clin Obstet Gynecol, 2007. **50**(4): p. 938-48.
2. Martins, T.D.D. and A.N. Costa, *Performance and behaviour of lactating sows raised in tropical climates*. Arch Zootec, 2008. **57**(R): p. 77-88.
3. Gupta, S., A. Agarwal, and R.K. Sharma, *The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia*. Obstet Gynecol Surv, 2005. **60**(12): p. 807-16.
4. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1999, New York: Oxford University Press.
5. Speakman, J.R., *The physiological costs of reproduction in small mammals*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1490): p. 375-98.
6. Alonso-Alvarez, C., et al., *Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction*. Ecology Letters, 2004. **7**(5): p. 363-368.
7. Sies, H., *Role of reactive oxygen species in biological processes*. Klin Wochenschr, 1991. **69**(21-23): p. 965-8.
8. Clapp, J.F., 3rd, et al., *Maternal physiologic adaptations to early human pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1988. **159**(6): p. 1456-60.
9. Pernoll, M.L., et al., *Ventilation during rest and exercise in pregnancy and postpartum*. Respir Physiol, 1975. **25**(3): p. 295-310.
10. Alaily, A.B. and K.B. Carrol, *Pulmonary ventilation in pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol, 1978. **85**(7): p. 518-24.
11. Gitto, E., et al., *Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin*. J Pineal Res, 2009. **46**(2): p. 128-39.

12. Toescu, V., et al., *Oxidative stress and normal pregnancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 2002. **57**(5): p. 609-13.
13. Kontic-Vucinic, O., M. Terzic, and N. Radunovic, *The role of antioxidant vitamins in hypertensive disorders of pregnancy*. J Perinat Med, 2008. **36**(4): p. 282-90.
14. Jauniaux, E., et al., *Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure*. Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 2111-22.
15. Skoner, J.M., J. Sigmon, and L.L. Larcom, *Suppressed DNA repair capacity of peripheral lymphocytes in pregnant women*. Mol Cell Endocrinol, 1995. **108**(1-2): p. 179-83.
16. Chen, X. and T.O. Scholl, *Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus*. Curr Diab Rep, 2005. **5**(4): p. 282-8.
17. Vasilaki, A., et al., *Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 109-17.
18. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
19. Rydberg, B. and K.J. Johanson, *Estimation of DNA strand breaks in single mamalian cells*. DNA repair mechanisms, 1978.
20. Östiling, O. and K.J. Johanson, *Microeletroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mamallian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(1): p. 291-298.
21. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.

22. Collins, A.R., et al., *DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(3): p. 373-7.
23. Wayner, D.D., et al., *Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins*. FEBS Lett, 1985. **187**(1): p. 33-7.
24. Cao, G. and R.L. Prior, *Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples*. Methods Enzymol, 1999. **299**: p. 50-62.
25. Aldini, G., et al., *A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(9): p. 1043-50.
26. Beretta, G., et al., *Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability*. Anal Biochem, 2006. **354**(2): p. 290-8.
27. Ferreira, A.L., et al., *Doxorubicin as an Antioxidant: Maintenance of Myocardial Levels of Lycopene under Doxorubicin Treatment*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(5): p. 740-751.
28. Adiga, U.S. and M.N.S. Adiga, *Total Antioxidant Activity in Normal Pregnancy*. Online Journal of Health and Allied Sciences, 2009. **8**(2): p. 1-4.
29. Wang, Y., et al., *The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **165**: p. 1695-1700.
30. De Vries, S.R., M. Dhont, and A.B. Christophe, *Oxidative stability of low density lipoproteins and vitamin E levels increase in maternal blood during normal pregnancy*. Lipids, 2001. **36**: p. 361-366.

31. Garratt, M., et al., *Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice*. Proc Biol Sci, 2011. **278**(1708): p. 1098-106.
32. Jones, M.L., et al., *Antioxidant defenses in the rat placenta in late gestation: increased labyrinthine expression of superoxide dismutases, glutathione peroxidase 3, and uncoupling protein 2*. Biol Reprod, 2010. **83**(2): p. 254-60.
33. Piccione, G., et al., *Assessment of oxidative stress in dry and lactating cows*. Acta Agriculturae Scand Section A 2007. **57**: p. 101-104.
34. Berchieri-Ronchi, C.B., et al., *Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation*. Animal. **5**(11): p. 1774-9.
35. Poston, L., et al., *Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2006. **367**(9517): p. 1145-54.
36. Polyzos, N.P., et al., *Combined vitamin C and E supplementation during pregnancy for preeclampsia prevention: a systematic review*. Obstet Gynecol Surv, 2007. **62**(3): p. 202-6.
37. Rumbold, A., et al., *Antioxidants for preventing pre-eclampsia*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1): p. CD004227.
38. Wibowo, N., et al., *Antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status*. J Obstet Gynaecol Res, 2012. **38**(9): p. 1152-61.
39. Rumiris, D., et al., *Lower rate of preeclampsia after antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status*. Hypertens Pregnancy, 2006. **25**(3): p. 241-53.
40. Pinelli-Saavedra, A., et al., *Effect of supplementing sows' feed with alpha-tocopherol acetate and vitamin C on transfer of alpha-tocopherol to piglet*

- tissues, colostrum, and milk: aspects of immune status of piglets.* Res Vet Sci, 2008. **85**(1): p. 92-100.
41. Pinelli-Saavedra, A., *Vitamin E in immunity and reproductive performance in pigs.* Reprod Nutr Dev, 2003. **43**(5): p. 397-408.
 42. Duda, G., et al., *Influence of the Lactating Women Diet on the Concentration of the Lipophilic Vitamins in Human Milk.* Pak J Nutr, 2009. **8**(5): p. 629-634.
 43. Perrone, S., et al., *Oxidative stress and nutrition in the preterm newborn.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **45 Suppl 3**: p. S178-82.
 44. Di Mascio, P., S. Kaiser, and H. Sies, *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher.* Arch Biochem Biophys, 1989. **274**(532-538).
 45. Agarwal, S. and A.V. Rao, *Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases.* Cmaj, 2000. **163**(6): p. 739-44.
 46. Stahl, W. and H. Sies, *Antioxidant activity of carotenoids.* Mol Aspects Med, 2003. **24**(6): p. 345-51.
 47. Wang, S., et al., *Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways.* J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25535-43.
 48. Lu, Y., et al., *A new carotenoid, hydrogen peroxide oxidation products from lycopene.* Biosci Biotech Biochem, 1995. **59**: p. 2153-2155.
 49. Ferreira, A.L.A., et al., *Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats.* Mutat Res, 2007. **631**: p. 26-35.

50. Antartani, A. and K. Ashok, *Effect of lycopene in prevention of preeclampsia in high risk pregnant women*. J Turkish-German Gynecol Assoc, 2011. **12**: p. 35-38.
51. Collins, A.R., et al., *Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes*. Carcinogenesis, 1998. **9**: p. 2159-2162.
52. Sharma, J.B., et al., *Effect of lycopene on pre-eclampsia and intra-uterine growth retardation in primigravidas*. Int J Gynaecol Obstet, 2003. **81**(3): p. 257-62.
53. Damasceno, D.C., et al., *Oxidative stress and diabetes in pregnant rats*. Anim Reprod Sci, 2002. **72**(3-4): p. 235-44.
54. Merzouk, H., et al., *Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes*. Clin Sci (Lond), 2000. **98**(1): p. 21-30.
55. Soulimane-Mokhtari, N.A., et al., *Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(3): p. 287-95.
56. Ferreira, A.L., et al., *Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation*. J Nutr, 2000. **130**(5): p. 1256-60.
57. Young, D.S., *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. AACCC Press, 1990(3).
58. Moura, R.A., et al., *Técnicas de Laboratório*. Atheneu, 2002(6).
59. Tice, R.R., et al., *The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells*. Biological Reactive Intermediates IV, Molecular and Cellular Effects and their Impact on Human Health, 1991(Plenum Press, New York): p. 157-164.

60. Ibrahim, H.S., L.A. Ahmed, and M.M.E. El-din, *The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats.* . J. Med. Food, 2008. **11**: p. 551-559.
61. Ali, M.M. and F.G. Agha, *Amelioration of streptozocin induced diabetes mellitus oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene.* . Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2009. **69**: p. 371-379.
62. Sanchez, J., et al., *Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life.* Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 733-40.
63. Zanella, R., et al., *Uso de antioxidantes para melhorar a eficiência reprodutiva de rebanho de bovinos submetidos a protocolo de sincronização com progesterona(P4).* . Ciência animal brasileira, 2010. **11**(3).
64. Christian, P., et al., *Effects of alternative maternal micronutrient supplements on low birth weight in rural Nepal: double blind randomised community trial.* Bmj, 2003. **326**(7389): p. 571.
65. West, K.P., Jr., et al., *Effects of vitamin A or beta carotene supplementation on pregnancy-related mortality and infant mortality in rural Bangladesh: a cluster randomized trial.* Jama, 2011. **305**(19): p. 1986-95.
66. Almeida, F.C.G., M.V.C. Rudge, and I.P. Lemônica, *Sistema de defesa antioxidante hepático de ratas prenhes diabéticas tratadas com extrato de Ginkgo biloba: Repercussão sobre a performance reprodutiva e o resultado perinatal.* Rev. Bras. Ginecol. Obstet. , 2003. **25**(1).
67. Viana, M., E. Herrera, and B. Bonet, *Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E.* Diabetologia, 1996. **39**(9): p. 1041-6.

68. Viana, M., et al., *Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(11): p. 1115-21.
69. Consonni, M., et al., *Effect of oral supplementation of the linoleic and gammalinolenic acids on the diabetic pregnant rats*. Braz. arch. biol. technol. , 2012. **55**(5).
70. Desoye, G., et al., *Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(4): p. 704-12.
71. Watts, G.F., et al., *Management of patients with severe hypertriglyceridaemia during pregnancy: report of two cases with familial lipoprotein lipase deficiency*. Br J Obstet Gynaecol, 1992. **99**(2): p. 163-6.
72. Barbalho, S.M., et al., *Evaluation of glycemic and lipid profile of offspring of diabetic Wistar rats treated with Malpighia emarginata juice*. Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 173647.
73. de Souza Mda, S., et al., *Effects of Passiflora edulis (yellow passion) on serum lipids and oxidative stress status of Wistar rats*. J Med Food, 2012. **15**(1): p. 78-82.
74. Luvizotto, R.A.M., et al., *Lycopene supplementation modulates leptin, resistin and IL-6 levels in diet-induced obese rats*. . [submitted] Journal of Nutrition, 2012.
75. Ferreira ALA, R.R., Rocha NS, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, Matsui M, Carvalho FA, Tang G, Matsubara LS, Matsubara BB. , *Effect of Lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: An echocardiographic, histological, and morphometrical assessment*. . Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Journal., 2007. **101**: p. 16-24.

76. Hui, B.D. and P.L. Peng, *Effect of gender on natural lycopene accumulation in rat serum and liver*. Food Science, 2010. **31**(17): p. 345-350.
77. Mein, J.R., F. Lian, and X.D. Wang, *Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention*. Nutr Rev, 2008. **66**(12): p. 667-83.
78. Mueller, A., et al., *Placental defence is considered sufficient to control lipid peroxidation in pregnancy*. Med Hypotheses, 2005. **64**(3): p. 553-7.
79. Waypa, G.B., N.S. Chandel, and P.T. Schumacker, *Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing*. Circ Res, 2001. **88**(12): p. 1259-66.
80. Li, L., et al., *Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice*. FEBS Lett, 2008. **582**(16): p. 2431-4.
81. Biri, A., et al., *Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes*. Placenta, 2006. **27**(2-3): p. 327-32.
82. Desai, P., et al., *Selenium levels and glutathione peroxidase activity in spontaneous inevitable abortion*. J Obstet Gynaecol India, 2006. **56**(4): p. 311-314.
83. Goth, L., et al., *Blood catalase activity in gestational diabetes is decreased but not associated with pregnancy complications*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2401-2404.
84. Surapaneni, K.M. and P.V. Vishnu, *Antioxidant enzymes and vitamins in gestational diabetes*. J Clin and Diagnostic Research, 2008. **2**: p. 1081-1085.
85. Funai, E.F., et al., *Glutathione peroxidase levels throughout normal pregnancy and in pre-eclampsia*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2002. **12**(5): p. 322-6.

86. Richelle, M., et al., *A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste*. J Nutr, 2002. **132**(3): p. 404-8.

Anexo 1

Diluição de Licopeno e checagem por Espectrofotometria

Têm-se Lyc-O-Mato 6% (frasco com volume de 38 mL)

$$6000 \text{ mg}/100 \text{ mL} = 60 \text{ mg}/1 \text{ mL}$$

Deseja-se que cada mL tenha 5 mg (2mL = 10mg)

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$60 \times 38 = 5 \times V2$$

$$2280 = 5 \times V2$$

$$V2 = 456 \text{ mL}$$

Portanto, deve-se acrescentar 456 mL de óleo mazola aos 38 mL que havia do Lyc-O-Mato 6%

Modo de diluir:

Aquecer 38 mL Lyc-O-Mato 6% no banho-maria à 54O C

Em separado, aquecer 456 mL de óleo mazola no banho-maria à 54O C

Misturar itens 1 e 2 ainda quentes em banho-maria à 54O C até a mistura tornar-se homogênea

Manter a 4°C (geladeira)

Para checar a concentração em espectrofotômetro

Tirou-se frasco da solução (lico + óleo) da geladeira e aqueceu-se em banho-maria temperatura 54 OC agitando-se manualmente por 20 min.

$$C \text{ (g/dL} = 1000\text{mg}/100\text{mL} = 10\text{mg/mL}) = \text{Absorbância } 472\text{mm} / E \%$$

$$E\%1\text{cm lycopene} = 3450$$

Diluiu-se 1000 (10 mL acetona + 10 uL licopeno) vezes para conseguir-se dosar no espectrofotômetro. Acetona foi utilizada como padrão de correção (blank).

$$\text{Absorbância} = 1,7$$

$$C = 1,7 / 3450 = 1,7 \times 1000 \text{ (fator de diluição)} \times 10 \text{ (unidade mg/mL)} = \text{tem que dar aproximado } 5 \text{ mg/mL (deu } 4,9275362) \sim 10\text{mg}/2\text{mL}$$

Calculo por peso corpóreo:

Cada 2 mL da solução (licopeno+óleo) tem 10 mg de licopeno

Desejamos dar 10mg/Kg peso corporeo = 10mg/1000g peso corpóreo

$$1000 \text{ g peso corpóreo} \text{ ---- } 2 \text{ mL}$$

$$X \text{ g peso corpóreo} \text{ ----- } Y$$

$$Y = 2 \times X / 1000$$



UNESP



FMB



CEEA

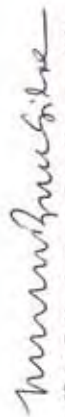
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIBEIRÃO PRETO
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética em Experimentação Animal

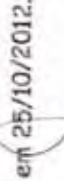
Criado através do Protocolo CEPA nº 38 de 28/04/99

Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 979-2012) "Efeito da suplementação com licopeno no estresse oxidativo induzido na prenhez", a ser conduzido por Carolina Bragiola Berchieri Ronchi, orientada pela Profª Drª Ana Lúcia dos Anjos Ferreira, Co-orientada pela Profª Drª Débora Cristina Damasceno, com a colaboração de Camila Renata Correa Camacho, Daisy Maria Favero Salvadori, Natália Carla Martins Miranda e Paula Torres Presti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/10/2012.

Diário Rúbilo Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.015-070 Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143 e-mail: secretaria@ceea.fmb.unesp.br

Desdobramentos da Tese

Doutorado-sanduíche foi realizado no centro de pesquisa *Jean Mayer – Human Nutrition Research Center on Aging – Tufts University*, Boston, MA, EUA. O estágio foi financiado pela CAPES (CAPES-PDEE # 0635-09-0) e foi supervisionado por Kyung-Jin Yeum, que é *Associate Professor* da Friedman School of Nutrition Science Policy da Tufts University e Professora Colaboradora de nosso Programa de Pós-Graduação. Durante este período foi desenvolvido um modelo experimental para avaliação do nível de estresse oxidativo durante a prenhez e lactação de suínos. Com estes resultados foi possível a elaboração de manuscrito já publicado (Anexo 3).

Além disso, foi possível a redação de mais 2 artigos. Um deles corresponde a artigo de revisão a ser submetido em periódico internacional (Anexo 4). E o outro artigo (Anexo 5) foi gerado com o objetivo de avaliar se a lesão do DNA pelo teste do cometa poderia ser determinada em sangue total congelado. Esse artigo ainda aborda a comparação de dois métodos de leitura das imagens de lesões de DNA (imagem aferida visualmente e imagem aferida via software).

Antes de apresentar os 3 artigos, é importante destacar o que se segue. Considerando as dificuldades técnicas da utilização de suínos em nossa unidade (Faculdade de Medicina de Botucatu), nós decidimos adotar outro modelo experimental de gestação mais apropriado à nossa estrutura. Assim, o projeto que originou a presente tese foi desenvolvido em ratas no laboratório do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia de nossa unidade.

Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation

C. B. Berchieri-Ronchi^{1,2}, S. W. Kim^{3†}, Y. Zhao³, C. R. Correa^{1,2}, K.-J. Yeum¹ and A. L. A. Ferreira²

¹Cometoids and Health Laboratory, Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, 02111 MA, USA; ²Botucatu Medical School, São Paulo State University UNESP, 13618-970 Botucatu, Brazil; ³Department of Animal Science, North Carolina State University, Raleigh, 27695 NC, USA

(Received 7 October 2010; Accepted 21 March 2011; First published online 3 June 2011)

Elevated oxidative stress is reported to be associated with pregnancy complications in highly prolific sows. Oxidative DNA damage and the antioxidant status were determined in blood samples collected during the course of gestation and lactation in multiparous sows. Blood samples were drawn from sows (n = 5) on days 30, 60, 90 and 110 of gestation (G30, G60, G90 and G110, respectively), on day 3, 10 and 18 of lactation (L3, L10 and L18, respectively) and on day 5 of postweaning (W5). Lymphocytes were isolated from the fresh blood and cryopreserved in each time point. Lymphocyte DNA damage was analyzed by alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to determine the single- and double-strand breaks and endogenous antioxidant concentrations using an HPLC system with UV detection. The comet assay showed elevated ($P < 0.05$) DNA damage (between 38% and 47%) throughout the gestational and lactational periods than during early gestation (G30; 21%). Plasma retinol concentration was reduced ($P < 0.05$) at the end of gestation (G110) compared with G30. Plasma α -tocopherol concentrations also showed a similar trend as to retinol. This study indicates that there is an increased systemic oxidative stress during late gestation and lactation, which are not fully recovered until the weaning compared with the G30, and that antioxidant nutrients in circulation substantially reduced in the mother pig at G110.

Keywords: antioxidant, DNA damage, oxidative stress, sows

Implications

Performance of breeding sows directly affects overall productivity of pig operation. Increased metabolic burdens on sows during late gestation and lactation cause elevated systemic oxidative stress during these important periods. Increased oxidative stress is related to decreased availability of antioxidants during late gestation and lactation, which begin to normalize towards the end of lactational period. It may be necessary to increase the vitamin E and A contents in the diet during the gestational period in order to compensate for the substantial loss of these nutrients.

Introduction

It has been suggested that pregnancy is a state of oxidative stress, which is characterized by the placental production of reactive oxygen species including superoxide and hydrogen peroxide (Casanueva and Viteri, 2003; Myatt and Cui, 2004;

Chen and Scholl, 2005). Excessive free radical production may cause both lipid and protein oxidation and impair normal endothelial cell function (Serdar *et al.*, 2008). The elevated oxidative stress could alter placenta and fetal skeletal formation as well (Prater *et al.*, 2008). In addition, oxidative stress and a disrupted antioxidant system are reported to be involved in a variety of pregnancy complications such as preterm labor, fetal growth restriction, preeclampsia and miscarriage (Gupta *et al.*, 2005; Sugino *et al.*, 2007). Numerous studies have also shown that oxidative stress plays a role in the pathophysiology of infertility (Tremellen, 2008; Ruder *et al.*, 2009) and assisted fertility (Agarwal *et al.*, 2005).

Single-cell microgel electrophoresis (the comet assay) has been developed to detect DNA single- or double-strand breaks. Broken DNA fragments result in an increased migration in electrophoresis to form a diffuse DNA area that resembles a comet tail after staining (Collins *et al.*, 1997). The main cause of DNA damage is attack by endogenous free radicals in particular superoxide radicals released from the respiratory chain in the mitochondria. Considering the steady-state level

[†] E-mail: sungwoo_kim@ncsu.edu

of damage, a balance between free radical attack and cellular repair is measured in the comet assay (Dusinska and Collins, 2010), and the evaluation of the both oxidative DNA damage and antioxidant status would provide the overall antioxidant defense and oxidative stress status.

Highly prolific sows may be under systemic oxidative stress, which can affect not only fertility and well-being of sows, but also the newborns. However, there is no study available to determine the oxidative stress status of sows determined by DNA damage during the gestational and lactational periods. Therefore, an animal model of pregnant sows has been utilized to assess oxidative stress as well as the antioxidant status during various time points of gestation and lactation.

Material and methods

Animals, management and sampling

Procedures used in this study were reviewed and approved by the North Carolina State University Animal Care and Use Committee and by Animal Research Ethics Committee of Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University.

Five pregnant sows with an average parity of 3.6 ± 0.5 and a body weight (BW) of 215.7 ± 24.6 kg at day 30 of gestation (G30) were used in this study. All pregnant sows were housed in gestation stalls (2.0×0.6 m) and fed 2.5 kg feed daily. Gestational diet contained 13.3% crude protein (CP), 3.34 MCal metabolizable energy/kg and other essential nutrients (Table 1) meeting suggested nutrient

requirements by National Research Council (NRC; 1998). Water was supplied *ad libitum*. BW of the sows was measured on G30 and G110.

On G110, all sows were weighed and moved to farrowing crates (2.1×1.5 m). During lactation, sows were fed *ad libitum*. Lactational diet contained 14.8% CP, 3.5 MCal metabolizable energy/kg and other essential nutrients (Table 1) meeting suggested nutrient requirements by NRC (1998). Average daily feed intake was recorded. BW of the sows was measured on days 1 and 18 of lactation (L1 and L18, respectively). Backfat thickness of sows was measured on L1 and L18 using an ultrasound scanner (Veterinary Sales and Service Inc., Stuart, FL, USA), as described by Mateo *et al.* (2009). Litter size and BW of each piglet were measured on L1 (within 12 h after farrowing) and L18. All piglets were weaned on L18. All sows were returned to the gestation stalls after weaning.

Blood samples (20 ml) were collected from all sows on G30, G60, G90 and G110; on L3, L10 and L18; and on, and day 5 of postweaning (W5) for analyses of lymphocyte DNA damage and plasma endogenous antioxidant concentrations.

Lymphocyte DNA damage

Lymphocytes were separated, cryopreserved and recovered for the alkaline single-cell gel electrophoresis as well as H_2O_2 challenged, as described previously by Zhao *et al.* (2006), with minor modifications.

Lymphocyte separation. Lymphocytes were separated immediately after blood samples were collected. Lymphocytes were isolated by density gradient sedimentation (Histopaque 1077; Sigma diagnostic, St. Louis, MO, USA) and frozen in 50% fetal calf serum, 40% culture medium (RPMI 1640; Sigma diagnostic) and 10% dimethyl sulfoxide to -80°C at $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ freezing rate before being stored in -80°C .

Cryopreserved lymphocyte recovery. Cells were recovered by submersion in a 37°C water bath until the last trace of ice was melted. The cells were transferred to prechilled 50% RPMI 1640 medium and 50% fetal calf serum and then centrifuged at $200 \times g$ for 5 min at 4°C . The cells were resuspended in cold phosphate buffered saline (pH 7.1 to 7.4, Ca^{++} , Mg^{++} free; Sigma-Aldrich) and checked for viability (typically $>95\%$ viability) and cell number (typically 1×10^5 cells/ml) using trypan blue exclusion test.

Alkaline single-cell gel electrophoresis. DNA strand breaks were measured in lymphocytes with the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. Hydrogen peroxide-challenged DNA damage was measured by exposing the cells to the hydrogen peroxide ($30 \mu\text{M}$) for 30 min in ice. All procedures were carried out under yellow light. Samples were coded and analyzed without knowledge of the identity of the sample.

Image analyses. The slides were stained with Syber Green (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) and determined using a fluorescent microscope at $\times 400$ magnification. Images from each of the two replicate slides per sample were analyzed

Table 1 Diets fed to sows during gestation and lactation (as-fed basis)

Ingredient	Gestation (%)	Lactation (%)
Corn, yellow	81.3	74.0
Soybean meal (48% CP)	13.8	17.5
Poultry fat	1.0	4.0
Lysine	0.0	0.2
Ground limestone	1.1	1.1
Monocalcium phosphate	2.1	2.4
Salt	0.5	0.5
Vitamin mineral premix ¹	0.2	0.3
Total	100.0	100.0
Calculated composition		
Dry matter	89.7	90.1
Metabolizable energy (MCal/kg)	3.3	3.5
CP	13.3	14.8
Lysine	0.6	0.9
Calcium	1.0	1.1
Total phosphorus	0.7	0.8

¹The vitamin mineral premix provided per kilogram of complete diet: 3.96 mg of Mn as manganous oxide; 16.5 mg of Fe as ferrous sulfate; 16.5 mg of Zn as zinc sulfate; 1.65 mg of Cu as copper sulfate; 0.30 mg of I as ethylenediamine dihydroiodide; 0.30 mg of Se as sodium selenite; 6614 IU of vitamin A as vitamin A acetate; 992 IU of vitamin D₃; 19.8 IU of vitamin E; 2.64 mg of vitamin K as menadiol sodium bisulfate; 0.03 mg of vitamin B₁₂; 4.63 mg of riboflavin; 18.52 mg of D-pantothenic acid as calcium pantothenate; 25.0 mg of niacin; and 0.07 mg of biotin.

using visual image analyses. The comet-like images were visually classified into four categories (0 to III) by a blinded observer according to appearance, which resulted from the relative proportion of DNA in the tail, as shown in Figure 1. At least a hundred cells were counted and categorized to avoid any selection bias.

To calculate and express the DNA damage, each slide was visually analyzed and calculated separately. The percentage of DNA damage in the tail was calculated to express the amount of DNA damage $\{[(a \times 5) + (b \times 20) + (c \times 45) + (d \times 80)] / (a + b + c + d)\}$; letters a, b, c and d represent the number of cells classified as 0, I, II and III, respectively. All slides were in duplicate for endogenous and H_2O_2 challenged DNA damage analyses.

Analysis of plasma fat-soluble antioxidants

A 100- μ l aliquot of plasma was used for tocopherols and retinol analysis as described previously (Zhao *et al.*, 2006), with minor modifications. Plasma samples were extracted with 2 ml of chloroform:methanol (2:1) followed by 3 ml of hexane. Samples were dried under nitrogen and resuspended in 75 μ l ethanol:methyl tert-butyl ether (2:1), of which 25 μ l was injected into the HPLC. The HPLC system consisted of a Waters 2695 Separation Module, 2996 Photodiode Array Detector, a Waters 2475 Multi- λ Fluorescence Detector, a C30 carotenoid column (3 μ m, 150 $\times$ 3.0 mm; YMC, Wilmington, NC, USA) and a Waters Millennium 32 software (Milford, MA, USA). The mobile phase was methanol:methyl tert-butyl ether:water (85:12:3 by volume with 1.5% ammonium acetate in water; solvent A) and methanol:methyl tert-butyl ether:water (8:90:2 by volume with 1% ammonium acetate in water; solvent B). The gradient procedure has been reported earlier (Yeum *et al.*, 1996). Results were adjusted by an internal standard containing edinenone. The inter- ($n=25$) and intra-assay ($n=9$) CV was 4%. The recovery of the added internal standard was consistently > 90%. All sample processing was carried out under red light.

Analysis of dietary antioxidant contents

As described previously by Ferreira *et al.* (2000), with minor modifications, carotenoid contents in the diet were determined by HPLC systems. Briefly, 400 mg of diet was incubated with methanol for 2 h at 37°C, followed by four sequential extractions with 10 ml tetrahydrofuran. Two ml of extract was dried under nitrogen gas, dissolved in 0.5 ml ethanol, dried under nitrogen gas and resuspended in 75 μ l ethanol:methyl tert-butyl ether (2:1), of which 25 μ l was injected into the HPLC. The HPLC system was set as the same as the plasma analysis.

Statistical analyses

Results from each time point were analyzed using repeated measures one-way ANOVA (Student Newman-Keuls) using SigmaStat version 2.0 for Windows 95 (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA). Results are expressed as mean $\pm$ s.d. Level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Sows gained 40.5 ± 3.6 kg from G30 to G110, but lost 14.0 ± 5.7 kg from L1 to L18 of lactation. Sows consumed 5.5 ± 0.4 kg feed daily. Piglets gained 252.0 ± 25.2 g daily during lactation (Table 2).

Figure 1 shows the visual classification used to determine DNA damage, as described by Zhao *et al.* (2006). Score 0 is the lowest, representing undamaged cells with 0% to 10% lesion and score 3 represents the most heavily damaged cells with 61% to 100% lesion (score 1 = 11% to 39%; score 2 = 40% to 60%). As shown in Figure 2, the endogenous comet assay showed significantly lower DNA damage at the early stage of gestation (G30), with 21.3% DNA damage. The oxidative DNA damage significantly increased in the second quarter of gestation and the high DNA damage level continued throughout the gestational and weaning periods. No statistical difference was found in H_2O_2 -induced DNA damage during the gestational and lactational periods (data are not shown).

Table 2 Performance of sows during gestation and lactation

	Mean	s.d.
<i>n</i>	5	
Parity	3.6	0.5
BW (kg)		
G30	215.7	24.6
G110	256.2	23.2
L1	238.8	22.9
L18	224.8	23.8
Backfat thickness (mm)		
L1	16.7	2.9
L18	15.3	3.0
Litter size		
At birth (day 1)	11.0	1.0
At weaning (day 18)	10.0	1.0
Litter weight (kg)		
At birth (day 1)	16.9	2.6
At weaning (day 18)	62.2	7.7
Daily feed intake (kg)	5.5	0.4
Piglet weight gain (g/day)	252.0	25.2

G30 = day 30 of gestation; G110 = day 110 of gestation; L1 = day 1 of lactation; L18 = day 18 of lactation.

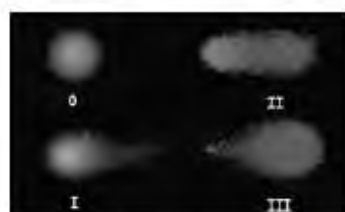


Figure 1 Visual classification of DNA damage according to the relative proportion of DNA in the tail (scores 0 to 3) by single-cell gel electrophoresis. Score 0 represents undamaged cells and score 3 represents the most heavily damaged cells (0 = 5%; 1 = 20%; 2 = 40%; 3 = >60%).

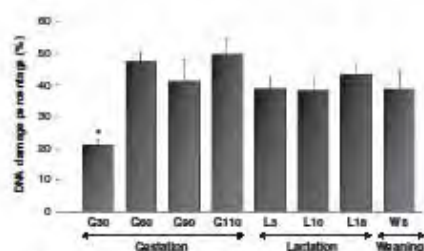


Figure 2 Lymphocyte DNA damage in multiparous sows during gestational, lactational and weaning periods; with lower ($P < 0.05$) endogenous DNA damage at day 30 of gestation (G30; 21%) as compared with those of the other time points (38% to 47% lesion) such as G60, G90, G110, L3, L10 and day 5 of postweaning (W5). Data are expressed as mean $\pm$ s.d. Value with an asterisk is significantly different at $P < 0.05$. The assay used was the single-cell gel electrophoresis. One-way ANOVA and Student Newman-Keuls method were used for normal distribution statistical analyses.

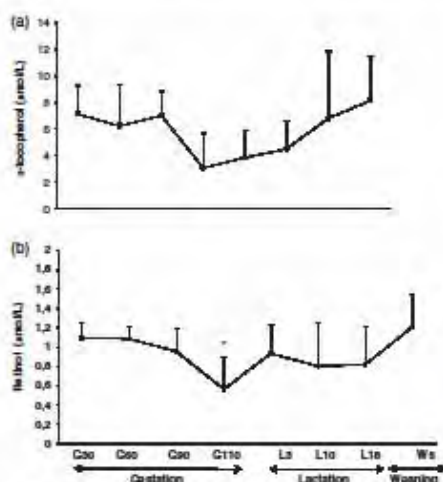


Figure 3 Plasma concentrations of α -tocopherol (a) and retinol (b) in multiparous sows. Data are expressed as mean $\pm$ s.d. Value with an asterisk is significantly different from days 30 and 60 of gestation (G30 and G60, respectively) and day 5 postweaning (W5) ($P < 0.05$). The analyses were performed using HPLC systems. Student's *t*-test was used for normal distribution statistical analyses.

Plasma α -tocopherol concentrations are shown in Figure 3. It started with 7.14 $\mu\text{mol/l}$ at the first quarter of gestational period (G30) and decreased to 3.07 $\mu\text{mol/l}$ at the end of gestation (G110). The α -tocopherol concentration went back up to being close to G30 at L18 and W5 showing 6.8 and 8.13 $\mu\text{mol/l}$, respectively. As shown in Figure 3, retinol concentration in the plasma was also reduced ($P < 0.05$) at G110 (0.57 $\mu\text{mol/l}$), as compared with those of G30, G60 and W5 (1.10, 1.08, 1.21 $\mu\text{mol/l}$, respectively).

Oxidative stress of sows

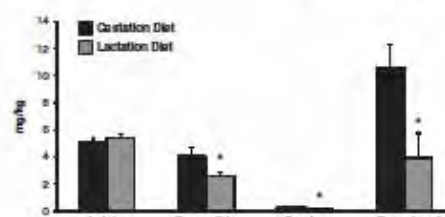


Figure 4 Fat-soluble antioxidant content in gestational and lactational diet. Data are expressed as mean $\pm$ s.d. Values with an asterisk or different letters are significantly different at $P < 0.05$. The analyses were performed using HPLC system. Student's *t*-test was used for normal distribution statistical analyses.

Fat-soluble antioxidant contents (carotenoids and tocopherols) in the sow diet were higher ($P < 0.05$), except for lutein, in the gestational diet than the lactational diet, as shown in Figure 4. Diets used in gestation and lactation contained 5.14 and 4.06 mg/kg of lutein; 4.44 and 2.61 mg/kg of zeaxanthin; 0.28 and 0.19 mg/kg of β -carotene; and 10.65 and 3.95 mg/kg of α -tocopherol, respectively.

Discussion

During gestation, there is a high energy demand and an increased oxygen requirement, which favors a state of oxidative stress due to the overproduction of reactive oxygen species (Agarwal *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2006). In this regard, there are clinical and experimental evidences that oxidative stress and/or low intake of antioxidant (Klemmensen *et al.*, 2009) is involved in the etiopathogenesis of the most frequent disorders in the gestational period (Hubel, 1999; Myatt and Cui, 2004; Jauniaux *et al.*, 2006).

This study utilized multiparous sow to better comprehend the status of oxidative stress during different stages of reproduction. The performance of all sows in this study was normal, which is similar to our previous publications, with regard to BW gain during gestation, BW changes during lactation, feed intake during gestation and lactation, litter size, litter birth weight and litter weight gain (Mateo *et al.*, 2007, 2008 and 2009; Kim *et al.*, 2009). In this study, there was no truly non-pregnant sow to compare the oxidative damage with pregnant sow because of practical difficulty in obtaining non-pregnant sows with similar age, parity and BW to those used in this study. But instead, G30 was served as a time point to compare the changes with those in mid-to late-gestation and lactation. Previously, it was shown that there is no significant changes occurring to sows in terms of maternal changes (Ji *et al.*, 2005), fetal growth (McPherson *et al.*, 2004) and mammary gland growth (Ji *et al.*, 2006). It has also shown that sows are not undergoing a catabolic status during G30 (Kim *et al.*, 2009).

There was an elevated oxidative DNA damage throughout the gestational, lactational and weaning periods. It is possible that the high metabolic demand during gestation may

induce the production of reactive oxygen species by the placenta, although the placenta is a source of antioxidative enzymes and hormone systems to control placental lipid peroxidation in healthy pregnancy (Mueller *et al.*, 2005). However, no significant difference was found in H₂O₂-induced DNA damage during the gestational, lactational and weaning periods, probably because of the high rate of basal DNA damage and the large variation of the DNA resistance among sows against oxidative stress.

This utilized cryopreserved lymphocytes for DNA damage determination. It has been reported that freezing of lymphocytes does not increase DNA strand breaks as compared to those of freshly isolated lymphocytes, and that fresh and frozen lymphocytes responded almost identically to hydrogen peroxide (Duthie *et al.*, 2002). Visual scoring system used in this study reported to be accurately corresponding to the data that are measured by computer image analysis in human lymphocytes (Collins, 2004), in equine lymphocyte (Marlin *et al.*, 2004) and in canine and feline leukocytes (Heaton *et al.*, 2002). The method used for visual scoring involves classifying comets into four categories on the basis of the perceived length of migration and relative proportion of DNA in the tail.

In pigs, the concentrations of vitamin E in plasma, tissues, colostrums and milk are reported to be highly responsive and directly correlated with changes in the dietary vitamin E intake (Pinelli-Saavedra, 2003). The sows in this study received different diets during gestational and lactational periods according to the nutrient requirements (NRC, 1998). Although the diet during the gestational period contained higher amount of α -tocopherol, plasma α -tocopherol concentrations were significantly lower at G110 as compared to those of the lactational period. It is plausible that there was a rapid transport of α -tocopherol from the mother to the piglets. Although the efficiency of placental transfer of vitamin E was reported to be limited when the maternal serum vitamin concentrations increased (Pinelli-Saavedra and Scaife, 2005), it is interesting to note that the plasma concentrations of vitamin E in the piglet is shown to be significantly influenced by the vitamin E concentrations of the sow's colostrum and milk (Pinelli-Saavedra *et al.*, 2008). In addition, the combination of antioxidant nutrients, such as vitamins E and C (Pinelli-Saavedra *et al.*, 2008), and selenium (Wuryastuti *et al.*, 1993) was reported to be beneficial for the sow's immune response.

Conclusions

This study showed that DNA damage is significantly augmented in the second quarter of gestational period (G60), maintaining elevated damage throughout the lactational period, and that it is still not completely recovered during the weaning period. The antioxidant nutrients that declined during the gestational period resulted in a significant drop at G110 and began to normalize towards the end of the lactational period. This study clearly indicates that sows are under increased systemic oxidative stress throughout the

late gestational and lactational periods compared with G30 and not fully recovered until the weaning period. In addition, it may be necessary to increase the vitamin E and A contents in the diet during the gestational period in order to compensate for the substantial loss of these nutrients. Further research studies warrant providing new approaches on oxidative stress attenuation and sufficient nutrient supply during reproduction.

Acknowledgement

The authors are grateful for the financial supports from North Carolina Pork Council, North Carolina Agricultural Foundation, US Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (Cooperative Agreement number 1950-51000-065-085), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, DF, Brazil (contract number 0635/09-0). Any opinions, findings, conclusion or recommendations expressed in this publication are those of the author(s) and do not necessarily reflect the view of the CAPES or USDA.

References

- Agarwal A, Saleh RA and Bedaiwy MA 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79, 829–843.
- Agarwal A, Gupta S and Sharma RK 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3, 28.
- Casanueva E and Viteri FE 2003. Iron and oxidative stress in pregnancy. *Journal of Nutrition* 133 (suppl. 2), 1700S–1708S.
- Chen X and Scholl TO 2005. Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Current Diabetes Reports* 5, 282–288.
- Collins AR 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249–261.
- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somarova M, Petrovská H, Duthie S, Filion L, Panayiotidis M, Raslova K and Vaughan N 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 139–146.
- Duthie SJ, Pirie L, Jenkinson AM and Narayanan S 2002. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis* 17, 211–214.
- Dusinska M and Collins A 2010. DNA oxidation, antioxidant effects and DNA repair measured with the comet assay. In *Biomarkers for antioxidant defense and oxidative damage: principles and practical applications* (ed. G. Aidi, KJ Yeum, E Niki and RM Russell), p. 363. Wiley-Blackwell, IA, USA.
- Ferreira AL, Yeum KJ, Liu C, Smith D, Kinsley NL, Wang XD and Russell RM 2000. Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *Journal of Nutrition* 130, 1256–1260.
- Gupta S, Agarwal A and Sharma RK 2005. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstetrical and Gynecological Survey* 60, 807–816.
- Heaton PR, Ransley R, Charlton CJ, Mann SJ, Stevenson J, Smith BH, Rawlings JM and Harper EJ 2002. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *Journal of Nutrition* 132 (suppl. 2), 1598S–1603S.
- Hubel CA 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222, 222–235.
- Jamnik J, Poston L and Burton GJ 2006. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Human Reproduction Update* 12, 747–755.
- Ji E, Hurley WL and Kim SW 2006. Characterization of mammary gland development in pregnant gilts. *Journal of Animal Science* 84, 579–587.
- Ji F, Wu G, Blanton JR and Kim SW 2005. Weight and compositional changes in pregnant gilts and its implication to nutrition. *Journal of Animal Science* 101, 366–375.

- Kim SW, Hurley WL, Wu G and Ji F 2009. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. *Journal of Animal Science* 87, E123–E132.
- Klemmensen A, Tabor A, Østerdal ML, Knudsen VK, Haldrupson TL, Mikkelsen TB and Olsen SF 2009. Intake of vitamin C and E in pregnancy and risk of preeclampsia: prospective study among 57 346 women. *BJOG* 116, 964–974.
- Marlin DJ, Johnson L, Kingston DA, Smith NC, Deaton CM, Mann S, Heaton P, van Vugt F, Saunders K, Kydd J and Harris PA 2004. Application of the comet assay for investigation of oxidative DNA damage in equine peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Nutrition* 134 (suppl. 2), 2133S–2140S.
- Mateo RD, Wu G, Moon HK, Carroll JA and Kim SW 2008. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. *Journal of Animal Science* 86, 827–835.
- Mateo RD, Carroll JA, Hyun Y, Smith S and Kim SW 2009. Effect of dietary supplementation of omega-3 fatty acids and high protein on reproductive outcome of primiparous sows for two parities. *Journal of Animal Science* 87, 948–959.
- Mateo RD, Wu G, Bazer FW, Park JC, Shinzato I and Kim SW 2007. Dietary L-arginine supplementation improves pregnancy outcome in gilts. *Journal of Nutrition* 137, 652–656.
- McPherson RL, Ji F, Wu G and Kim SW 2004. Fetal growth and compositional changes of fetal tissues in the pigs. *Journal of Animal Science* 82, 2534–2540.
- Mueller A, Koebnick C, Binder H, Hoffmann I, Schild RL, Beckmann MW and Dittrich R 2005. Placental defence is considered sufficient to control lipid peroxidation in pregnancy. *Medical Hypotheses* 64, 553–557.
- Myatt L and Cui X 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and Cell Biology* 122, 369–382.
- National research Council (NRC) 1998. Nutritional requirements of pigs, 10th edition. National Academy Press, Washington, DC.
- Rinelli-Savedra A 2003. Vitamin E in immunity and reproductive performance in pigs. *Reproduction Nutrition Development* 43, 397–408.
- Rinelli-Savedra A and Scaife JR 2005. Pre- and postnatal transfer of vitamin E and C to piglets in sows supplemented with vitamin E and vitamin C. *Livestock Production Science* 97, 231–240.
- Rinelli-Savedra A, Calderon De La Barca AM, Hernandez J, Valenzuela R and Scaife JR 2008. Effect of supplementing sows' feed with alpha-tocopherol acetate and vitamin C on transfer of alpha-tocopherol to piglet tissues, colostrum, and milk: aspects of immune status of piglets. *Research in Veterinary Science* 85, 92–100.
- Prater MR, Laudemilch CL, Liang C and Holladay SD 2008. Placental oxidative stress alters expression of murine osteogenic genes and impairs fetal skeletal formation. *Placenta* 29, 802–808.
- Royes MR, Sifuentes-Alvarez A and Lazalde B 2006. Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 85, 1090–1093.
- Ruder EH, Hartman TJ and Goldman MB 2009. Impact of oxidative stress on female fertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 21, 219–222.
- Sendar Z, Gur E, Colekothallary M, Deweleth O and Samad E 2003. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 268, 19–25.
- Sugino N, Takiguchi S, Umekawa T, Heazell A and Caniggia I 2007. Oxidative stress and pregnancy outcome: a workshop report. *Placenta* 28 (suppl. A), S48–S50.
- Timmelen K 2008. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update* 14, 243–258.
- Wuryastuti H, Stowe HD, Bull RW and Miller ER 1993. Effects of vitamin E and selenium on immune responses of peripheral blood, colostrum, and milk leukocytes of sows. *Journal of Animal Science* 71, 2464–2472.
- Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Kinsley N and Russell RM 1996. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition* 64, 594–602.
- Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Muscarel N, Kinsley N, Russell RM and Yeum KJ 2006. Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 83, 163–169.

1 **Damaging effects from oxidative stress induced during reproduction - A review**

2

3 CB Berchieri-Ronchi ^{1,*}, CR Correa ², DC Damasceno ³, K-J Yeum ⁴, Daisy Maria
4 Favero Salvadori ², ALA Ferreira ¹

5 ¹ Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, Sao Paulo State
6 University (UNESP), CEP: 18618-970, Botucatu, SP, Brazil;

7 ² Department of Pathology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University
8 (UNESP), Botucatu, SP, Brazil;

9 ³ Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Sao Paulo State
10 University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil;

11 ⁴ Carotenoids and Health Laboratory, Jean Mayer USDA Human Nutrition Research
12 Center on Aging, Tufts University, Boston, MA, USA

13

14 * To whom correspondence should be addressed: Carolina Bragiola Berchieri-Ronchi,
15 Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, CEP
16 18618-970, Botucatu, SP, Brasil, Phone/FAX +55-14-3880-1171 / 3882.2238;
17 carolinaberchieri@yahoo.com.br

18
19 Supported in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
20 (CAPES), Brasília, DF, Brazil (contract number 0635/09-0, PDEE scholarship) and by a
21 grant the U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service under
22 Cooperative Agreement number 1950-51000-065. Any opinions, findings, conclusion,
23 or recommendations expressed in this publication are those of the author(s) and do not
24 necessarily reflect the view of the CAPES, UNESP or U.S. Dept of Agriculture.
25

26 **Abstract**

27 Pregnancy is a dynamic anabolic state, in which within several weeks of
28 conception, the placenta secretes hormones that affects the metabolism of all nutrients.
29 Consequently remarkable events occur during this period for sustaining mother and
30 fostering the growth and maintenance of fetus. Thus, early pregnancy can be seen as an
31 anabolic state in the mother with an increase in fat reserves and insulin sensitivity. In
32 contrast, the end of pregnancy is a catabolic state and an increase in oxidative damage.
33 There is evidence that pregnancy is a state of high oxidative stress (OS) in animals and
34 humans. Given its high ability to damage important cellular components (lipids,
35 proteins, carbohydrates and deoxyribonucleic acid, DNA), OS is now recognized as one
36 of the most common mechanisms associated with development of a variety of diseases
37 and also natural events such as pregnancy. During reproduction there is a change in the
38 pro-oxidant and antioxidant defenses associated with body and circulation modifications
39 that are inherent to the pregnancy process. An oxidation/reduction imbalance occurs
40 with increase in OS coupled with a decreased capacity of antioxidant systems.
41 Pregnancy is a period of constant OS, which extends itself until lactation, when mothers
42 have to provide for their breed. The use of antioxidant supplementation to attenuate
43 these effects is still under investigation. Further studies, both experimental as well as
44 clinical trials are needed for better comprehension.

45

46

47

48

49

50

51 Introduction

52 Pregnancy is characterized by dynamic changes in various organs resulting in
53 increased basal oxygen consumption and changes in the use of energy substrates, both
54 maternal and fetal. Early pregnancy is associated to anabolic state in the mother with an
55 increase in fat reserves and insulin sensitivity. Nutrients are stored in early pregnancy to
56 meet the placental and fetal-maternal late pregnancy and lactation demands. In contrast,
57 the end of pregnancy corresponds to catabolic state showing a decrease in insulin
58 sensitivity, which results in increased maternal glucose and free fatty acid
59 concentrations, allowing greater substrate availability for fetal growth [1].

60 There is evidence that pregnancy is a state of high oxidative stress (OS) both in
61 animals [2] and in humans [3]. Oxidative stress is an event resultant from an imbalance
62 between reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) generation and antioxidant
63 system defense magnitude. Antioxidant defense comprehend reduced glutathione,
64 glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase, uric acid, bilirubin, albumin,
65 ascorbate, some flavonoids, protein thiols (hydrophilic compartment) and carotenoids,
66 tocopherols (lipophilic compartment). The actions of antioxidants in biological systems
67 depend on the nature of oxidants or ROS/RNS imposed on the systems, and the
68 activities and amounts of antioxidants present and their cooperative/synergistic
69 interactions in these systems [4].

70 Oxidative stress can cause oxidative damage in vulnerable targets such as
71 unsaturated fatty acyl chains in membranes, thiol groups in proteins, and nucleic acid
72 bases in DNA [4]. Given its high ability to damage important cellular components
73 (lipids, proteins, carbohydrates and deoxyribonucleic acid, DNA), OS is now
74 recognized as one of the most common mechanisms associated with development of a
75 variety of diseases [5] and natural events such pregnancy [6, 7].

76 There are several factors triggering OS during pregnancy. Placenta has an
77 important influence on fetal homeostasis. Rich in mitochondria, the placenta consumes
78 1% of maternal basal metabolic rate when fully developed [8]. Parallel to the increase in
79 metabolic rate, there is a rise in maternal minute ventilation (35-50%) to achieve the
80 requirement of maternal and fetal oxygenation [9]; [10]; [11]. Furthermore, the high
81 metabolic demand due to the high oxygen demand for irrigation of the tissues may
82 promote increased generation of ROS [12]. Besides low antioxidant status at early
83 gestation (before end of first trimester), placenta exist in a hypoxic environment with
84 the intrauterine oxygen tension extremely low ($pO_2 < 20$ mmHg, $\sim 5\%$ O_2) at 8 weeks
85 [13], condition that may induce an increase in reactive oxygen specie generation [14].
86 This highly aerobic environment is probably the primary responsible for the increased
87 oxidative stress in pregnancy. On the other hand, placenta shows progressive increment
88 of antioxidant enzyme expression and/or activity (glutathione peroxidase, glutathione
89 reductase, catalase, Cu/ZnSOD) accordingly with gestational stage [15].

90 Throughout pregnancy, lipid peroxides are formed which bind to lipoproteins
91 and are then transported to other body regions. Thus, damage occurs not only at the site
92 where the reactive species are formed, but also occurs distant from that site. Therefore,
93 this transport promotes dissemination of lipid peroxides, which features an
94 amplification and perpetuation of oxidative injury [3].

95 It has also been suggested an increased inflammatory status during gestation,
96 which increases susceptibility to ROS generation [16] with consequent placental OS as
97 placental maternal circulation is established [13]. Inflammation and ROS/RNS
98 association also causes DNA damage. DNA injury can affect several physiological
99 processes related to the health status of the pregnancy. Furthermore, the ability to repair

100 DNA became reduced in pregnant women, making them more vulnerable to
101 environmental and endogenous toxins that may lead to diseases [17].

102 Pregnancy *per se* is susceptible to OS and antioxidant defenses may be altered in
103 response to elevated levels of reactive species [18]. However, this increase does not
104 necessarily mean an extent in OS [19] since it occurs a number of antioxidant defense
105 mechanisms in response to increased ROS repairing damage and limiting possible
106 subsequent occurrences [20]; [21].

107 Temperature is an external factor of direct influence on reproductive
108 performance resulting in infertility [22];[23]; [24]. In fact, the stress generated by heat
109 can lead to large effects on mammalian reproductive function, such as interruptions in
110 spermatogenesis and development of oocytes, oocyte maturation, early embryonic
111 growth, fetal and placental development, as well as in lactation. These harmful effects
112 of heat stress are the result of both hyperthermia associated with stress as well as
113 physiological adjustments by stressed animals to regulate body temperature [24]. High
114 body temperatures [25] and high metabolic rates [26]; [27] lead to increased production
115 of reactive oxygen species (ROS), which react with various molecules in cells, such as
116 lipids, proteins and nucleic acids, and result in cellular injury [28]; [29]. Maternal heat
117 stress was associated with an increase in intracellular H₂O₂ concentrations and the
118 reduction of glutathione content within the embryos [30]. Genetic adaptation to stress
119 generated by heat is possible with regard to body temperature regulation and also by
120 cellular resistance to high temperatures [24]. Intensive cooling to completely eliminate
121 heat stress in lactating dairy cows results in close to normal fertility, indicating that
122 short periods of hyperthermia compromise fertility [31]. Hot weather reduces milk
123 production in cows [32], lowers reproductive efficiency in ruminants [33], and
124 decreases reproduction in dairy cattle and duration and intensity of estrus [34].

125 In addition to factors such as temperature, type of housing where animals are
126 kept for breeding seems to have a direct influence on stress levels. Individual housing
127 showed greater behavioral arousal, as well as changes in immune-endocrinologicals
128 parameters affecting the response to stressors in rats [35]; [36], fish [37] and pigs [38].
129 In studies assessing stress levels in animals kept in grouped cages, some animals
130 showed aggression due to food competition [39], while rabbits showed preference and
131 comfort in collective environments [40]. Recent study showed that, individually housed
132 sows are under elevated systemic OS, especially at the end of gestation and during
133 lactation compared to early pregnancy, and are not fully recovered until the weaning
134 period [41].

135

136 *Antioxidant defense status and reproduction*

137 Studies that examined the antioxidant defense system have shown controversial
138 results. Recently it was observed increase in antioxidant enzymatic and non-enzymatic
139 during pregnancy. Nevertheless, the hydrophilic antioxidant capacity was decreased
140 [42]. It is reported that the ability of hydrophilic [43] and lipophilic [44]; [45]
141 antioxidant defense system are progressively reduced during pregnancy. Moreover,
142 study reports the development of a strong defense mechanism against oxidative damage
143 as the pregnancy progresses [43].

144 Studies in rats have shown that females use mechanisms to deal with the
145 consequences of increased energy demands [46], such as, the increase in antioxidant
146 defense genes expression genes [47]. Examining cows in lactation, it has been shown
147 that efficiency in antioxidant defenses is able to keep oxidative homeostasis, despite the
148 increased oxidative phenomenon under the influence hormonal and metabolic [48]. On
149 other hand, sows are under high systemic oxidative stress, especially at the end of

150 gestation and during lactation compared to early pregnancy and not fully recovered until
151 the weaning period [41].

152

153 *Pregnancy complications*

154 Oxidative stress is also event related to complications of pregnancy. In fact, the
155 mechanism of pregnancy interruption [3, 49], pre-eclampsia and growth retardation
156 intrauterine [3] has been associated with oxidative stress in various animal species. High
157 oxidative stress accompanied by the reduction of endogenous defenses can mediate
158 several diseases in creating [12]. A recent study showed decreased glutathione
159 peroxidase activity was associated with a reduction of selenium in pregnant women who
160 have suffered abortion or pre-eclampsia [50].

161 *Lactation*

162 There is evidence of the presence of antioxidant agents in colostrum and milk in
163 cows [51]. Data obtained from bovine colostrum and milk showed dynamic changes in
164 total antioxidant capacity within seven days postpartum [52]. Study in pigs showed that
165 milk provides a higher concentration of antioxidants between the second to fifth
166 lactation, offering best defense against ROS for mammary glands and newborns [53].
167 Examining coenzyme Q10 concentration, previous report identified its highest breast
168 milk concentration from mothers of full-term infants, which decreasing during lactation.
169 In addition, coenzyme Q10 and α and γ concentrations of-tocopherol in human milk
170 directly correlated with the antioxidant capacity of milk [54].

171 Examining mice lactation, a recent study showed no evidence of increased of
172 malondialdehyde (liver, gastrocnemius muscle and serum) or antioxidant compromise
173 (total glutathione, protein thiol content, oxidized glutathione) when compared virgin
174 females, primiparous females at peak lactation, and primiparous females after their first

litter was fully weaned [46]. Other reported more lipid peroxidation and low glutathione in plasma from dairy cows in early gestation as compared to those of advanced pregnant [55].

Neonates

Newborns may also suffer interference from oxidative stress. Clinical study found oxidative DNA damage in mononuclear cells from umbilical cord blood, as well as other redox state index, suggesting that a sudden increase in oxygenation may exposes the newborn to oxidative stress [56]. On the other hand, it has been suggested that the newborn may show a compensatory mechanism against oxidative stress during intrauterine life. The low level of oxidative stress at birth associated with low levels of fat-soluble antioxidants and abundant vitamin C concentrations suggests that the newborn begins life with low levels of oxidative stress due to the protection afforded by ascorbic acid [57].

Given the growing role of OS in newborn preterm morbidity, providing the baby with amino acid substrates for cellular glutathione synthesis immediately after birth promotes antioxidant defense improvement at the early stages of life. Breast milk has been found to have many advantages over formula, including the potential to provide antioxidant protection to infants [58].

Antioxidant supplementation and reproduction

Studies that examined the antioxidant supplementation have shown controversial results. Early supplementation for women with low antioxidant micronutrient containing antioxidants during pregnancy may reduce the risk of pre-eclampsia [59]. Supplementation with the combination of various nutrients and antioxidants (n-

200 acetylcysteine, selenium, zinc, copper, manganese, iron, B complex, folic acid, calcium
201 and vitamin A, C, E) was associated with better outcomes of both maternal and
202 perinatal pregnant women with deficient antioxidant defense when compared to control.
203 Furthermore, pre-eclampsia was significantly less frequent in women that received the
204 supplementation as compared to those of control group [60].

205 Using an experimental model in pigs, our group recently documented the
206 increased oxidative stress (oxidative DNA damage) associated with the reduction of fat
207 soluble antioxidants in plasma of sows during pregnancy [41]. Adopting the same
208 animal model, previous study showed that dietary supplementation with α -tocopherol
209 during pregnancy resulted in an increase of its concentration in colostrum, milk, and
210 tissues and plasma from the creates at weaning. In the same study it was further shown
211 that the combination of α -tocopherol and dietary vitamin C increased concentration of
212 total immunoglobulins and IgG in plasma from the creates [61]. Review by Pinelli-
213 Saavedra [62] suggests that dietary supplementation or injection of vitamin E with
214 selenium in sows had a positive effect on reproductive performance than vitamin E
215 administered alone.

216 Recent clinical study showed that dietary deficiency of vitamins A and E during
217 lactation mother was correlated with low levels of these vitamins in breast milk [63].
218 Similarly, maternal inadequate dietary intake of vitamin A and selenium during
219 lactation significantly decreased the concentration of these nutrients in milk [58].

220 Supplementation with lycopene seems to influence the risks related to
221 gestational preeclampsia [64] [65]. Ashok et al. [64] showed that although lycopene
222 does not prevent pre-eclampsia in women, may reduce fetal complications. This may be
223 due to improvements in selective movement fetoplacental compared to the general

224 circulation. In primiparous women, previous report suggests that lycopene reduces the
225 development of pre-eclampsia and growth retardation intrauterine [64] [66].

226 On the other hand, absence of effect of antioxidant supplement has been reported.
227 Previous study observed that pregnant diabetic mice treated with *G.biloba* extract as a
228 supplement did not alter antioxidant parameters in dam and breed, not improving the
229 reproductive performance and perinatal outcomes [67].

230 Supplementation with vitamins C (1000 mg) and E (400 IU) for 14 to 22 weeks'
231 gestation did not prevent pre-eclampsia in women at increased risk [68]. Others showed
232 that combined vitamin C and E supplementation during pregnancy did not prevent
233 ~~reduce~~ the risk of preeclampsia, fetal or neonatal loss, small for gestational age infant,
234 or preterm birth [69].

235 Aiming to investigate the efficacy of antioxidants for preventing preeclampsia
236 and other maternal and fetal complications among pregnant women with low, moderate,
237 or high risk of preeclampsia, a systematic review did not support the use of antioxidants
238 during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other outcomes [70].

239 Other systematic review by Rumbold et al covered 10 trials, involving 6533
240 women, and looked at several antioxidants. Overall the review found no reduction in
241 pre-eclampsia, high blood pressure or preterm birth with the use of antioxidant
242 supplements. When antioxidants were assessed separately, there were
243 insufficient data to be clear about whether there was any benefit or not, except for
244 vitamin C and E. The current evidence in this review does not support the use of
245 antioxidants to reduce the risk of pre-eclampsia or other complications in pregnancy
246 [71].

247

248 It may be emphasized that the actions of antioxidants in biological systems
249 depend on the nature of oxidants or ROS/RNS imposed on the systems, and the
250 activities and amounts of antioxidants present and their cooperative/synergistic
251 interactions in these systems. High doses of a single or limited mixture of antioxidant
252 supplements may not affect the already saturated *in vivo* antioxidant network, but rather
253 could result in an imbalance in the antioxidant network and could possibly even act as
254 pro-oxidants [4].

255 Although oxidative stress is important in reproduction process, there are
256 insufficient data to make a recommendation regarding antioxidant supplementation
257 alone, or in combination with other antioxidants. Indiscriminate use of antioxidant
258 supplements should be discouraged due to the undesirable pro-oxidant phenomenon.
259 The beneficial action of a particular antioxidant is the result of a delicate synergism
260 between antioxidants present in the lipophilic and hydrophilic compartments. Thus, a
261 single antioxidant supplementation may trigger irreversible commitment of all
262 antioxidant defense system. Further studies, both experimental as well as clinical trials
263 are needed for better comprehension.

264
265

266

267

268

269

270

271

272

273 References

274

- 275 1. Lain, K.Y. and P.M. Catalano, *Metabolic changes in pregnancy*. Clin Obstet
276 Gynecol, 2007. 50(4): p. 938-48.
- 277 2. Martins, T.D.D. and A.N. Costa, *Performance and behaviour of lactating sows*
278 *raised in tropical climates*. Arch Zootec, 2008. 57(R): p. 77-88.
- 279 3. Gupta, S., A. Agarwal, and R.K. Sharma, *The role of placental oxidative stress*
280 *and lipid peroxidation in preeclampsia*. Obstet Gynecol Surv, 2005. 60(12): p.
281 807-16.
- 282 4. Yeum, K.J., R.M. Russell, and G. Aldini, *Antioxidant activity and oxidative*
283 *stress: an overview*. Biomarkers of oxidative stress status: Principles and
284 Practical Applications, 2010(Wiley and Blackwell Inc. USA.): p. 3-19.
- 285 5. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*.
286 1999, New York: Oxford University Press.
- 287 6. Speakman, J.R., *The physiological costs of reproduction in small mammals*.
288 Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. 363(1490): p. 375-98.
- 289 7. Alonso-Alvarez, C., et al., *Increased susceptibility to oxidative stress as a*
290 *proximate cost of reproduction*. Ecology Letters, 2004. 7(5): p. 363-368.
- 291 8. Sies, H., *Role of reactive oxygen species in biological processes*. Klin
292 Wochenschr, 1991. 69(21-23): p. 965-8.
- 293 9. Clapp, J.F., 3rd, et al., *Maternal physiologic adaptations to early human*
294 *pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1988. 159(6): p. 1456-60.
- 295 10. Pernoll, M.L., et al., *Ventilation during rest and exercise in pregnancy and*
296 *postpartum*. Respir Physiol, 1975. 25(3): p. 295-310.
- 297 11. Alaily, A.B. and K.B. Carrol, *Pulmonary ventilation in pregnancy*. Br J Obstet
298 Gynaecol, 1978. 85(7): p. 518-24.
- 299 12. Gitto, E., et al., *Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period*. Biol
300 Neonate, 2002. 81(3): p. 146-57.
- 301 13. Jauniaux, E., et al., *Onset of maternal arterial blood flow and placental*
302 *oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure*. Am J
303 Pathol, 2000. 157(6): p. 2111-22.
- 304 14. Waypa, G.B., N.S. Chandel, and P.T. Schumacker, *Model for hypoxic*
305 *pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing*. Circ Res,
306 2001. 88(12): p. 1259-66.
- 307 15. Mueller, A., et al., *Placental defence is considered sufficient to control lipid*
308 *peroxidation in pregnancy*. Med Hypotheses, 2005. 64(3): p. 553-7.
- 309 16. Kontic-Vucinic, O., M. Terzic, and N. Radunovic, *The role of antioxidant*
310 *vitamins in hypertensive disorders of pregnancy*. J Perinat Med, 2008. 36(4): p.
311 282-90.
- 312 17. Skoner, J.M., J. Sigmon, and L.L. Larcom, *Suppressed DNA repair capacity of*
313 *peripheral lymphocytes in pregnant women*. Mol Cell Endocrinol, 1995. 108(1-
314 2): p. 179-83.
- 315 18. Chen, X. and T.O. Scholl, *Oxidative stress: changes in pregnancy and with*
316 *gestational diabetes mellitus*. Curr Diab Rep, 2005. 5(4): p. 282-8.
- 317 19. Speakman, J.R., E. Krol, and M.S. Johnson, *The functional significance of*
318 *individual variation in basal metabolic rate*. Physiol Biochem Zool, 2004. 77(6):
319 p. 900-15.

- 320 20. Vasilaki, A., et al., *Free radical generation by skeletal muscle of adult and old*
321 *mice: effect of contractile activity*. Aging Cell, 2006. 5(2): p. 109-17.
- 322 21. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological*
323 *functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(1): p. 44-84.
- 324 22. Banks, S., et al., *Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine*
325 *spermatozoa*. Reproduction, 2005. 129(4): p. 505-14.
- 326 23. Sartori, R., et al., *Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers*
327 *and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter*. Journal
328 of Dairy Science, 2002. 85(11): p. 2803-2812.
- 329 24. Hansen, P.J., *Effects of heat stress on mammalian reproduction*. Philos Trans R
330 Soc Lond B Biol Sci, 2009. 364(1534): p. 3341-50.
- 331 25. Ikeda, M., et al., *Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell*
332 *apoptosis induced by heat stress*. Biol Reprod, 1999. 61(2): p. 393-9.
- 333 26. Ji, L.L., *Antioxidants and oxidative stress in exercise*. Proceedings of the Society
334 for Experimental Biology and Medicine, 1999. 222: p. 283-292.
- 335 27. Niess, A.M., et al., *Free radicals and oxidative stress in exercise:*
336 *immunological aspects*. Exercise Immunology Review 1999. 5: p. 22-56.
- 337 28. Lin, P.S., et al., *Hyperthermia enhances the cytotoxic effects of reactive oxygen*
338 *species to Chinese hamster cells and bovine endothelial cells in vitro*.
339 Reproduction Research 1991. 126(43-51).
- 340 29. Wells, P.G., et al., *Oxidative damage in chemical teratogenesis*. Mutat Res,
341 1997. 396(1-2): p. 65-78.
- 342 30. Ozawa, M., M. Hirabayashi, and Y. Kanai, *Developmental competence and*
343 *oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro*.
344 Reproduction, 2002. 124(5): p. 683-9.
- 345 31. Thatcher, W.W., et al., *Interrelationships of Heat Stress and Reproduction in*
346 *Lactating Dairy Cows*. High Plains Dairy Conference, 2010.
- 347 32. Kadzere, C.T., et al., *Heat stress in lactating dairy cows: a review*. Livestock
348 Production Science 2002. 77: p. 59-91.
- 349 33. Silanikove, N., *Effects of heat stress on the welfare of extensively managed*
350 *domestic ruminants*. Livestock Production Science, 2000. 67: p. 1-18.
- 351 34. Jordan, E.R., *Effects of Heat Stress on Reproduction*. J Dairy Sci, 2003. 86: p.
352 104-114.
- 353 35. Bartolomucci, A., et al., *Individual housing induces altered immuno-endocrine*
354 *responses to psychological stress in male mice*. Psychoneuroendocrinology,
355 2003. 28(4): p. 540-58.
- 356 36. Palermo-Neto, J., et al., *Effects of individual housing on behavior and resistance*
357 *to Ehrlich tumor growth in mice*. Physiol Behav, 2008. 95(3): p. 435-40.
- 358 37. Parker, M.O., et al., *Housing conditions differentially affect physiological and*
359 *behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics*.
360 PLoS One. 7(4): p. e34992.
- 361 38. Rhodes, R.T., et al., *A comprehensive review of housing for pregnant sows*. J
362 Am Vet Med Assoc, 2005. 227(10): p. 1580-90.
- 363 39. Jansen, J., et al., *Influence of gestation housing on sow behavior and fertility*.
364 Journal of Swine Health and Production 2007. 15(3).
- 365 40. Zotte, A.D., et al., *Rabbits' Preference for cages and pens with or without*
366 *mirrors*. Appl Anim Behav Sci, 2008. 116: p. 273-278.
- 367 41. Berchieri-Ronchi, C.B., et al., *Oxidative stress status of highly prolific sows*
368 *during gestation and lactation*. Animal. 5(11): p. 1774-9.

- 369 42. Adiga, U.S. and M.N.S. Adiga, *Total Antioxidant Activity in Normal Pregnancy*.
370 Online Journal of Health and Allied Sciences, 2009. 8(2): p. 1-4.
- 371 43. Toescu, V., et al., *Oxidative stress and normal pregnancy*. Clin Endocrinol
372 (Oxf), 2002. 57(5): p. 609-13.
- 373 44. Wang, Y., et al., *The imbalance between thromboxane and prostacyclin in
374 preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and
375 vitamin E in maternal blood*. Am J Obstet Gynecol, 1991. 165: p. 1695-1700.
- 376 45. De Vriesi, S.R., M. Dhont, and A.B. Christophe, *Oxidative stability of low
377 density lipoproteins and vitamin E levels increase in maternal blood during
378 normal pregnancy*. Lipids, 2001. 36: p. 361-366.
- 379 46. Garratt, M., et al., *Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An
380 experimental test in house mice*. Proc Biol Sci, 2011. 278(1708): p. 1098-106.
- 381 47. Jones, M.L., et al., *Antioxidant defenses in the rat placenta in late gestation:
382 increased labyrinthine expression of superoxide dismutases, glutathione
383 peroxidase 3, and uncoupling protein 2*. Biol Reprod, 2010. 83(2): p. 254-60.
- 384 48. Piccione, G., et al., *Assessment of oxidative stress in dry and lactating cows*.
385 Acta Agriculturae Scand Section A. 2007. 57: p. 101-104.
- 386 49. Agarwal, A., S. Gupta, and S. Sikka, *The role of free radicals and antioxidants
387 in reproduction*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. 18(3): p. 325-32.
- 388 50. Mistry, H.D. and P.J. Williams, *The importance of antioxidant micronutrients in
389 pregnancy*. Oxid Med Cell Longev. 2011: p. 841749.
- 390 51. Lindmark-Mansson, H. and B. Akesson, *Antioxidative factors in milk*. Br J Nutr,
391 2000. 84 Suppl 1: p. S103-10.
- 392 52. Kankofer, M. and J. Lipko-Przybylska, *Physiological antioxidative/oxidative
393 status in bovine colostrum and mature milk*. Acta Vet Beograd, 2008. 58: p. 231-
394 239.
- 395 53. Lipko-Przybylska, J. and M. Kankofer, *Antioxidant defence of colostrum and
396 milk in consecutive lactations in sows*. Irish Veterinary Journal 2012. 65(4).
- 397 54. Quiles, J.L., et al., *Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of
398 human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term
399 infants*. Free Radical Research, 2006. 40(2): p. 199-206.
- 400 55. Sharma, N., et al., *Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition
401 Period in Dairy Cows*. Asian Aust J Anim Sci, 2011. 24(4): p. 479-484.
- 402 56. Zhao, J., et al., *DNA damage in healthy term neonate*. Early Hum Dev, 2004.
403 77(1-2): p. 89-98.
- 404 57. Upadhyaya, C., et al., *ANTIOXIDANT STATUS AND PEROXIDATIVE STRESS
405 IN MOTHER AND NEWBORN – A PILOT STUDY*. Indian Journal of Clinical
406 Biochemistry, 2005. 20(1): p. 30-34.
- 407 58. Perrone, S., et al., *Oxidative stress and nutrition in the preterm newborn*. J
408 Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. 45 Suppl 3: p. S178-82.
- 409 59. Wibowo, N., et al., *Antioxidant supplementation in pregnant women with low
410 antioxidant status*. J Obstet Gynaecol Res. 38(9): p. 1152-61.
- 411 60. Ruminis, D., et al., *Lower rate of preeclampsia after antioxidant
412 supplementation in pregnant women with low antioxidant status*. Hypertens
413 Pregnancy, 2006. 25(3): p. 241-53.
- 414 61. Pinelli-Saavedra, A., et al., *Effect of supplementing sows' feed with alpha-
415 tocopherol acetate and vitamin C on transfer of alpha-tocopherol to piglet
416 tissues, colostrum, and milk: aspects of immune status of piglets*. Res Vet Sci,
417 2008. 85(1): p. 92-100.

- 418 62. Pinelli-Saavedra, A., *Vitamin E in immunity and reproductive performance in*
419 *pigs*. Reprod Nutr Dev, 2003. 43(5): p. 397-408.
- 420 63. Duda, G., et al., *Influence of the Lactating Women Diet on the Concentration of*
421 *the Lipophilic Vitamins in Human Milk*. Pak J Nutr, 2009. 8(5): p. 629-634.
- 422 64. Antartani, A. and K. Ashok, *Effect of lycopene in prevention of preeclampsia in*
423 *high risk pregnant women*. J Turkish-German Gynecol Assoc, 2011. 12: p. 35-
424 38.
- 425 65. Palan, P.R., M.S. Mikhail, and S.L. Romney, *Placental and serum levels of*
426 *carotenoids in preeclampsia*. Obstet Gynecol, 2001. 98(3): p. 459-62.
- 427 66. Sharma, J.B., et al., *Effect of lycopene on pre-eclampsia and intra-uterine*
428 *growth retardation in primigravidas*. Int J Gynaecol Obstet, 2003. 81(3): p. 257-
429 62.
- 430 67. Almeida, F.C.G., M.V.C. Rudge, and I.P. Lemonica, *Sistema de defesa*
431 *antioxidante hepático de ratas prenhes diabéticas tratadas com extrato de*
432 *Ginkgo biloba: Repercussão sobre a performance reprodutiva e o resultado*
433 *perinatal*. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., 2003. 25(1).
- 434 68. Poston, L., et al., *Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-*
435 *eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2006.
436 367(9517): p. 1145-54.
- 437 69. Polyzos, N.P., et al., *Combined vitamin C and E supplementation during*
438 *pregnancy for preeclampsia prevention: a systematic review*. Obstet Gynecol
439 Surv, 2007. 62(3): p. 202-6.
- 440 70. Salles, A.M., et al., *Antioxidants for preventing preeclampsia: a systematic*
441 *review*. ScientificWorldJournal, 2012. 2012: p. 243476.
- 442 71. Rumbold, A., et al., *Antioxidants for preventing pre-eclampsia*. Cochrane
443 Database Syst Rev, 2008(1): p. CD004227.
- 444 72. Leal, C.A., et al., *Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women*.
445 Redox Rep. 16(6): p. 230-6.
446
447

Elsevier Editorial System(tm) for Mutation Research - Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Single-cell gel electrophoresis using directly frozen whole blood: a new perspective for DNA damage analysis

Article Type: Research Paper

Keywords: Comet assay; Whole blood; Oxidative stress; DNA damage

Corresponding Author: Dr Kyung-Jin Yeum,

Corresponding Author's Institution: Jean Mayer USDA-Human Nutrition Research Center on Aging

First Author: Carlos F Ronchi

Order of Authors: Carlos F Ronchi; Carolina B Berchieri-Ronchi; Camila R Correa; Ana Lucia A Ferreira; Giancarlo Aldini; Sung Woo Kim; Kyung-Jin Yeum

Abstract: Oxidative DNA damage is known to be associated with initiating and/or promoting chronic diseases. To determine the usefulness of directly frozen whole blood without cryoprotectant on the analysis of DNA damage, lymphocytes isolated from the fresh blood followed by cryopreservation as well as collected from the frozen whole blood in either EDTA- or DNA-stabilized tubes were analyzed in parallel for DNA damage using a single cell gel electrophoresis, comet assay. In addition, variations of the scoring system for the comet assay were also evaluated by comparing 1) two different scoring systems (visual- vs. computer-image analysis), 2) two different examiners' visual image analyses, and 3) scores counted from different numbers of cells (50 vs. 100). Blood samples were collected from non-smokers aged over 50 years (n=5) and an animal model, sows (n=5). The lymphocyte DNA damage (% DNA in tail) in frozen whole blood showed similar results as compared to those of cryopreserved lymphocytes in humans. In animal samples, the lymphocyte DNA damage in the frozen whole blood in EDTA- or DNA-tubes was significantly lower than the cryopreserved lymphocytes (Cryo: 45.8 ± 5.88 > DNA: 37.52 ± 6.72 = EDTA: 40.1 ± 3.65 , $p < 0.05$). Similar results were obtained when the DNA was challenged with H₂O₂ (Cryo: 51.9 ± 2.04 > DNA: 43.3 ± 5.43 = EDTA: 40.7 ± 6.42 , $p < 0.05$). There was no significant difference between the visual- and the computer-image analyses ($r = 0.69$, $p < 0.001$). In addition, visual image analyses of two examiners agreed with each other ($r = 0.90$, $p < 0.001$). Furthermore, the number of cells (50 vs. 100) to determine the DNA damage did not affect the result ($r = 0.73$, $p < 0.001$). This study indicates that whole blood directly frozen without cryoprotectant can be utilized for oxidative DNA damage analysis when time and cost are limiting factors and that its quantification method is rugged.

3

6

12

17

24 this publication are those of the authors and do not necessarily reflect the view of the

25 U.S. Department of Agriculture, FAPESP or CAPES.

26

27 Abstract

28

29 Oxidative DNA damage is known to be associated with initiating and/or
 30 promoting chronic diseases. To determine the usefulness of directly frozen whole blood
 31 without cryoprotectant on the analysis of DNA damage, lymphocytes isolated from the
 32 fresh blood followed by cryopreservation as well as collected from the frozen whole
 33 blood in either EDTA- or DNA-stabilized tubes were analyzed in parallel for DNA
 34 damage using a single cell gel electrophoresis, comet assay. In addition, variations of
 35 the scoring system for the comet assay were also evaluated by comparing 1) two
 36 different scoring systems (visual- vs. computer-image analysis), 2) two different
 37 examiners' visual image analyses, and 3) scores counted from different numbers of
 38 cells (50 vs. 100). Blood samples were collected from non-smokers aged over 50 years
 39 (n=5) and an animal model, sows (n=5). The lymphocyte DNA damage (% DNA in tail)
 40 in frozen whole blood showed similar results as compared to those of cryopreserved
 41 lymphocytes in humans. In animal samples, the lymphocyte DNA damage in the frozen
 42 whole blood in EDTA- or DNA-tubes was significantly lower than the cryopreserved
 43 lymphocytes (Cryo: 45.8 ± 5.88 > DNA: 37.52 ± 6.72 = EDTA: 40.1 ± 3.65 , $p < 0.05$).
 44 Similar results were obtained when the DNA was challenged with H_2O_2 (Cryo: $51.9 \pm$
 45 2.04 > DNA: 43.3 ± 5.43 = EDTA: 40.7 ± 6.42 , $p < 0.05$). There was no significant
 46 difference between the visual- and the computer-image analyses ($r = 0.69$, $p < 0.001$). In
 47 addition, visual image analyses of two examiners agreed with each other ($r = 0.90$,
 48 $p < 0.001$). Furthermore, the number of cells (50 vs. 100) to determine the DNA damage
 49 did not affect the result ($r = 0.73$, $p < 0.001$). This study indicates that whole blood directly

50 frozen without cryoprotectant can be utilized for oxidative DNA damage analysis when
51 time and cost are limiting factors and that its quantification method is rugged.

52

53 **Key words:** Comet assay, Whole blood, Oxidative stress, DNA damage

54

55 1. Introduction

56

57 The single cell gel electrophoresis (SCGE), also known as the Comet assay, has
58 become one of the standard methods for assessing DNA damage with applications in
59 genotoxicity testing, human biomonitoring and molecular epidemiology, ecotoxicology,
60 as well as fundamental research in DNA damage and repair [1-4] including DNA double-
61 strand breaks, single-strand breaks, alkali-labile sites, incomplete repair of abasic sites
62 and cross-links. Significant advantages of the Comet assay over other genotoxicity tests
63 include its fairly simple methodology, sensitivity, requirement for small numbers of cells,
64 and rapid production of data [5-6]. However, researchers need to be aware that the
65 technique is very sensitive to subtle changes (e.g., temperature, buffer volume, and pH)
66 that can yield appreciable variability in results [7], and a standardized protocol enabling
67 direct comparisons between laboratories is not in our hand yet [8-9].

68

69 Common lymphocytes [10], and occasionally buccal cells [11] and sperms [12]
70 have been used to assess DNA damage using the Comet assay. However, the isolation
71 of lymphocytes represents a possible source of artifacts and involves time-consuming
72 procedures. Overcoming this limitation, Hininger et al. [13] reported the usefulness of
73 cryopreserved whole blood using dimethyl sulfoxide (DMSO) for a Comet assay.
74 Considering directly frozen whole blood without DMSO retains intact cytoplasmic
75 membranes which are enveloping nuclei with preserved DNA [14], directly frozen whole
76 blood without cryoprotectant may be utilized for comet assay. This simple application
77 could be proven to be useful for a number of research and clinical applications such as

78 field study, prospective study and multicenter trials with respect to the cost-efficiency
79 and minimizing variability. Based on this, lymphocytes collected from frozen whole
80 blood in a DNA-stabilized tube as well as a regular EDTA tube were compared with
81 cryopreserved lymphocytes obtained from fresh blood for DNA damage determined by
82 Comet assay. In addition, variation of the DNA damage scoring system of Comet assay
83 were evaluated by comparing 1) two different scoring methods (visual image analysis
84 and computer image analysis) 2) two different examiners' visual image analysis and 3)
85 DNA damage scores obtained from different number of cells.

86

87 2. Materials and Methods

88

89 2.1. Chemicals

90 N-lauroyl sarcosinate, dimethyl sulfoxide (DMSO), RPMI 1640 cell culture
91 medium, sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), hydrogen peroxide (H₂O₂),
92 normal and low melting point agarose, Tris, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and
93 histopaque 1077 were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO);
94 Triton X-100 and chlorohydric acid (HCl) from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ); Syber
95 Green from Trevigen Inc. (Gaithersburg, MD); and trypan blue from Merck (Darmstadt,
96 Germany).

97

98 2.2. Sample collection

99

100 **Animal's samples:** Blood samples (10 mL) were collected from sows (n = 5),
 101 aged from 6 months to 3 years. Procedures used in this study were reviewed and
 102 approved by the North Carolina State University Animal Care and Use Committee and
 103 by Animal Research Ethics Committee at Jean Mayer USDA-Human Nutrition Research
 104 Center on Aging at Tufts University.

105 **Human's samples:** Blood samples (5 mL) were taken from non-smoking
 106 volunteers (n=5) aged over 50 years old. The protocol was approved by the Institutional
 107 Review Board of Tufts Medical Center and Tufts University Health Sciences, and all
 108 subjects provided written informed consent to participate.

109

110 **2.3. Lymphocyte isolation, cryopreservation and recovery**

111 Lymphocytes were immediately isolated after the blood collection. Isolation was
 112 performed by a density gradient sedimentation (Histopaque 1077, Sigma Diagnostics)
 113 and frozen in a mixture containing 50% fetal bovine serum, 40% culture medium (RPMI
 114 1640, Sigma Diagnostics), and 10% dimethyl sulfoxide at a freezing rate of -1°C / min to
 115 a final temperature of -80°C before store in liquid nitrogen [15] . Cells were recovered by
 116 submersion in a 37 °C water bath. The cells were placed in a pre chilled 50% RPMI
 117 1640 medium combined with 50% fetal bovine serum and then were centrifuged at 200
 118 X g for 5 min at 4 °C. The cells were resuspended in 250 µL of cold phosphate buffered
 119 saline and checked for viability (typically ≥ 95% viability) and cell number (typically 1 x
 120 10⁵ cells/mL).

121

122 **2.4. Whole blood Collection, lymphocyte isolation:**

123 Five milliliters of whole blood were collected in two different tubes, an EDTA tube
 124 and a DNA stabilized tube, in sows. In human samples one milliliter of whole blood was
 125 collected in the EDTA tube and stored at -80°C. Lymphocytes in frozen whole blood
 126 were recovered as follows. One milliliter of whole blood was added to 1 mL of Ca²⁺- and
 127 Mg²⁺- free phosphate-buffered saline (PBS) and gently mixed and then centrifuged 200
 128 X g for 5 min at 4 °C. The excess of supernatant was discarded and 1 mL of PBS was
 129 used to wash the cells twice and then 1500 µL of cold PBS was added, mixed and
 130 placed on ice.

131

132 2.5. *Single-cell gel electrophoresis analysis (Comet assay)*

133 DNA strand breaks were measured in lymphocytes obtained from cryopreserved
 134 lymphocytes and frozen whole blood using alkaline single-cell gel electrophoresis
 135 (Comet assay) as proposed by Singh et al. [16], Tice et al. [17] and Collins et al. [2],
 136 with some modifications.

137 Volumes of 20 µL of cells obtained from lymphocytes or whole blood were added
 138 to 150 µL of 0.5% low melting point agarose at 37 °C. From the mixtures, 130 µL were
 139 layered onto slides precoated with 1.5% normal agarose, covered with a coverslip, and
 140 left for 5 min at 4 °C to solidify the agarose. For hydrogen peroxide-induced DNA strand
 141 break analysis, cells (recovered from cryopreserved lymphocytes or frozen whole blood)
 142 were incubated with hydrogen peroxide (30 µmol/L for 30 min on ice) and used for DNA
 143 damage challenge. Subsequently, the coverslips were carefully removed and the slides
 144 immersed in a lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris [pH 10], 1% N-
 145 lauroyl sarcosine sodium, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) for 24 h. Then, the slides

146 were washed with PBS for 5 minutes and immersed in a freshly prepared alkaline buffer
 147 (1mM EDTA, 300mM NaOH [pH> 13]) in a horizontal electrophoresis tray. After 40 min
 148 DNA unwinding period, electrophoresis was conducted at 25 V and 300mA for 30 min,
 149 followed by 15 min neutralization with 0.4M Tris buffer (pH 7.5). The slides were
 150 washed in absolute ethanol and stored at room temperature for drying. The gels on
 151 each slide were stained with 50 μ l SYBRgreen (Trevigen, Gaithersburg, MD) and dilute
 152 1:10,000 in Tris-EDTA buffer. The slides were examined using a fluorescent microscope
 153 at 400x magnification [18]. Every step was carried out under indirect light. Slides were
 154 coded and analyzed without knowledge of the identity of the sample.

155

156 2.6. Quantification of DNA damage

157 DNA damage was measured by two different examiners using the computer
 158 scoring system (Comet assay IV Software, Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolk,
 159 UK) and also visual image analysis, as previously described [19], with minor
 160 modifications. The Comet-like images were classified visually into 4 categories (0–3) by
 161 a blinded examiner according to the appearance, which resulted from the relative
 162 proportion of DNA damage in the tail, as shown in Figure 1. In order to avoid any
 163 selection bias, at least 100 cells were counted and categorized. The percentage of DNA
 164 damage in the tail $[(5 \times \text{cells}_0 + 20 \times \text{cells}_1 + 45 \times \text{cells}_2 + 80 \times \text{cells}_3) / \sum \text{cells}]$ was
 165 calculated to express the amount of DNA damage.

166

167 2.7. Statistical analysis

168 The results are expressed as mean $\pm$ SD and the significance of differences
169 were calculated by Student's *t* test. The statistical analysis was performed using
170 SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc. San Jose, CA). Statistical significance was
171 considered when $p < 0.05$.

172

173 3. Results

174 There was no significant difference in endogenous DNA damage (% DNA in tail)
175 between cryopreserved lymphocyte isolated from the fresh blood and lymphocytes
176 obtained from directly frozen whole blood without cryoprotectant as shown in Table 1.
177 However, when H₂O₂-induced DNA strand breaks were analyzed, lymphocytes isolated
178 from directly frozen whole blood were more susceptible to oxidative stress than freshly
179 isolated lymphocytes (Table 1). Figure 2 shows the significant correlation of DNA
180 damage between lymphocytes isolated from the fresh blood and lymphocytes collected
181 from the directly frozen whole blood.

182

183 Additionally, DNA damage was compared in animal samples using lymphocytes
184 isolated from fresh blood and cryopreserved at -80°C, and collected from frozen whole
185 blood in two different types of tubes; DNA-stabilized and EDTA tubes. As compared to
186 cryopreserved lymphocytes (45.8 ± 5.88), less DNA endogenous damage (% DNA in
187 tail) was found in lymphocytes obtained from whole blood collected in either DNA-
188 stabilized (37.5 ± 6.72) or EDTA tubes (40.1 ± 3.65), $p < 0.05$] (Figure 3). Similar results
189 were obtained when H₂O₂-induced DNA strand breaks were analyzed [Cryopreserved

190 (51.9 ± 2.04) > DNA stabilized tube (43.3 ± 5.43) = EDTA tube (40.7 ± 6.42); $p < 0.05$
 191 (Figure 3).

192

193 There was no difference in DNA damage quantification between visual image
 194 analysis and computer image analysis [$r=0.69$, $p < 0.001$] (Figure 4). In addition two
 195 different examiners' evaluations of DNA damage by visual image analysis agreed with
 196 each other [$r=0.90$, $p < 0.001$] (Figure 5). Furthermore the number of cells (50 vs. 100)
 197 counted for DNA damage showed similar results [$r=0.73$, $p < .001$] (Figure 6).

198

199 4. Discussion

200 The use of freshly isolated or cryopreserved lymphocytes [2, 10, 15, 20-21], or
 201 cryopreserved whole blood with DMSO [13, 22-23] to determine DNA damage using a
 202 Comet assay has been well established. Considering the report on lymphocyte subset
 203 analysis [14] indicating intact cytoplasmic membrane enveloping nuclei in lymphocytes
 204 obtained from directly frozen whole blood without cryoprotectant. It is plausible that the
 205 directly frozen whole blood without cryoprotectant could be utilized for DNA damage
 206 analysis using a Comet assay since DNA may be well preserved in the frozen whole
 207 blood. Such approach would be useful when time and cost are limiting factors. In
 208 addition, not only the inter-laboratory variation, which is largely due to differences in
 209 protocols such as alkali unwinding, electrophoresis [8-9, 24], but also intra-laboratory
 210 variation such as image analysis can hinder objectivity of the assessment of DNA
 211 damage by the Comet assay.

212

213 In the current study, lymphocytes recovered from directly frozen whole blood
214 showed similar degree of DNA damage as compared to those isolated from the fresh
215 blood and cryopreserved in humans. It is plausible that the cytoplasmic membrane
216 protects nuclei of the DNA during the freezing and thawing processes. In addition,
217 blood components such as protein and fat might protect the formation of ice crystal in
218 whole blood. It may also be possible that the presence of antioxidants in whole blood
219 may have a protective effect against oxidative DNA damage that might occur during the
220 storage. In the animal model, cryopreserved lymphocytes showed higher DNA damage
221 as compared to those collected from frozen whole blood in either EDTA- or DNA-
222 stabilized tubes. It is possible that the time delay from blood collection from the animal
223 farm to lymphocyte isolation in the laboratory may cause DNA damage. As suggested
224 by Chuang and Hu [22], white blood cells were easily collected from the directly frozen
225 whole blood by undergoing hemolysis of red blood cells followed by a brief
226 centrifugation. Taken together, the current study indicates that DNA damage can be
227 determined from the small amount of directly frozen whole blood without cryoprotectant.
228

229 In agreement with previous reports, the visual image analysis agreed with the
230 computer image analysis to determine the DNA damage in human lymphocytes [25], in
231 equine lymphocyte [26], and in canine and feline leucocytes [27]. Furthermore two
232 different examiner's visual image analyses significantly correlated in the current study
233 indicating the minimal inter-examiner variation on the DNA damage scoring system.
234 Although assessment of DNA damage with different cell numbers significantly

235 correlated, the score of DNA damage tends to be lower when fewer cells were counted
236 probably due to the selection bias.

237

238 When hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks were analyzed,
239 lymphocytes isolated from frozen whole blood were more susceptible to hydrogen
240 peroxide exposure than the freshly isolated lymphocytes. It should be noted, however,
241 that endogenous DNA damages tended to be higher in the directly frozen whole blood
242 as compared to those of freshly isolated and cryopreserved lymphocytes. Although
243 fresh and frozen lymphocytes would respond almost identically to hydrogen peroxide
244 treatment [21] and DNA repair [28], lymphocytes collected from the directly frozen whole
245 blood were likely more prone to the oxidative challenge.

246

247 The current study indicates that directly frozen whole blood can be used for DNA
248 damage analysis applying the Comet assay. Moreover, there were no differences
249 between visual image analyses and computer image analysis, in the number of cells
250 counted for image analysis, and the visual analyses of different examiners. Applying
251 the comet assay in directly frozen whole blood would be proven to be useful for large
252 epidemiologic study conducted in the field, although further studies warrant evaluating
253 the usefulness of directly frozen whole blood for DNA damage.

254

255 **Acknowledgement**

256 We thank the entire staff of Experimental Laboratory of North Carolina State
257 University and Carotenoids and Health Laboratory of HNRC at Tufts University for their
258 assistance.

259

260

261

262 **Table 1** - Endogenous and H₂O₂ challenged DNA damage (% DNA in tail) in human
 263 blood samples analyzed by two independent examiners using visual image analysis

	Endogenous		H ₂ O ₂ challenged	
	LYM	WB	LYM	WB
	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
Examiner 1	23.64 ± 2.9	30.22 ± 0.7	27.57 ± 2.0	38.92 ± 0.7*
Examiner 2	22.43 ± 1.7	26.55 ± 0.6	32.17 ± 1.3	39.06 ± 1.3*

264 LYM = Lymphocytes isolated from freshly whole blood and cryopreserved;

265 WB = Lymphocytes isolated from directly frozen whole blood

266 Values are means ± SD, **p* < 0.05 unpaired t-test Between LYM and WB

267

268

269

270 **References:**

- 271 1. A.R. Collins, The comet assay. Principles, applications, and limitations, *Methods*
272 *Mol Biol.* 203 (2002) 163-77.
- 273 2. A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles,
274 applications, and limitations, *Mol Biotechnol.* 26 (2004) 249-61.
- 275 3. P. Moller, L. Moller, R.W. Godschalk, G.D. Jones, Assessment and reduction of
276 comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European
277 Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis.* 25 (2010) 109-11.
- 278 4. P. Moller, S. Loft, Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged
279 DNA, *Free Radic Biol Med.* 41 (2006) 388-415.
- 280 5. R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y.
281 Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines
282 for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen.* 35 (2000)
283 206-21.
- 284 6. T.S. Kumaravel, B. Vilhar, S.P. Faux, A.N. Jha, Comet Assay measurements: a
285 perspective, *Cell Biol Toxicol.* 25 (2009) 53-64.
- 286 7. L.D. Knopper, J.P. McNamee, Use of the comet assay in environmental toxicology,
287 *Methods Mol Biol.* 410 (2008) 171-83.
- 288 8. C. Johansson, P. Moller, L. Forchhammer, S. Loft, R.W. Godschalk, S.A. Langie,
289 S. Lumeij, G.D. Jones, R.W. Kwok, A. Azqueta, et al., An ECVAG trial on
290 assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay,
291 *Mutagenesis.* 25 (2010) 125-32.

- 292 9. L. Forchhammer, C. Johansson, S. Loft, L. Moller, R.W. Godschalk, S.A. Langie,
 293 G.D. Jones, R.W. Kwok, A.R. Collins, A. Azqueta, et al., Variation in the
 294 measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-
 295 laboratory validation trial, *Mutagenesis*. 25 (2010) 113-23.
- 296 10. C. Betti, T. Davini, R. Barale, Genotoxic activity of methyl mercury chloride and
 297 dimethyl mercury in human lymphocytes, *Mutat Res*. 281 (1992) 255-60.
- 298 11. Y.T. Szeto, I.F. Benzie, A.R. Collins, S.W. Choi, C.Y. Cheng, C.M. Yow, M.M. Tse,
 299 A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human
 300 biomonitoring and nutritional studies, *Mutat Res*. 578 (2005) 371-81.
- 301 12. D. Anderson, M.M. Dobrzynska, T.W. Yu, L. Gandini, E. Cordelli, M. Spano, DNA
 302 integrity in human sperm, *Teratog Carcinog Mutagen*. 17 (1997) 97-102.
- 303 13. I. Hininger, A. Chollat-Namy, S. Sauvaigo, M. Osman, H. Faure, J. Cadet, A.
 304 Favier, A.M. Roussel, Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total
 305 blood: method and evaluation in smokers and non-smokers, *Mutat Res*. 558 (2004)
 306 75-80.
- 307 14. E.W. Fiebig, D.K. Johnson, D.F. Hirschkom, C.C. Knape, H.K. Webster, J. Lowder,
 308 M.P. Busch, Lymphocyte subset analysis on frozen whole blood, *Cytometry*. 29
 309 (1997) 340-50.
- 310 15. X. Zhao, G. Aldini, E.J. Johnson, H. Rasmussen, K. Kraemer, H. Woolf, N.
 311 Musaeus, N.I. Krinsky, R.M. Russell, K.J. Yeum, Modification of lymphocyte DNA
 312 damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women, *Am J Clin*
 313 *Nutr*. 83 (2006) 163-9.

- 314 16. N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for
 315 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res.* 175
 316 (1988) 184-91.
- 317 17. R.R. Tice, P.W. Andrews, O. Hirai, N.P. Singh, The single cell gel (SCG) assay: an
 318 electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells, *Adv*
 319 *Exp Med Biol.* 283 (1991) 157-64.
- 320 18. M.G. Braz, D.M. Favero Salvadori, Influence of endogenous and synthetic female
 321 sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay, *Toxicol In*
 322 *Vitro.* 21 (2007) 972-6.
- 323 19. A.R. Collins, M. Dusinska, Oxidation of cellular DNA measured with the comet
 324 assay, *Methods Mol Biol.* 186 (2002) 147-59.
- 325 20. M.S. Ladeira, R.C. Bueno, B.F. Dos Santos, C.L. Pinto, R.P. Prado, M.G. Silveira,
 326 M.A. Rodrigues, W. Bartchewsky, Jr., J. Pedrazzoli, Jr., M.L. Ribeiro, et al.,
 327 Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and the
 328 relevance of *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori*, *Dig Dis Sci.* 53
 329 (2008) 248-55.
- 330 21. S.J. Duthie, L. Pirie, A.M. Jenkinson, S. Narayanan, Cryopreserved versus freshly
 331 isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA
 332 damage, antioxidant status and repair capability, *Mutagenesis.* 17 (2002) 211-4.
- 333 22. C.H. Chuang, M.L. Hu, Use of whole blood directly for single-cell gel
 334 electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay, *Mutat*
 335 *Res.* 564 (2004) 75-82.

- 336 23. V.L. Stevens, A.V. Patel, H.S. Feigelson, C. Rodriguez, M.J. Thun, E.E. Calle,
337 Cryopreservation of whole blood samples collected in the field for a large
338 epidemiologic study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16 (2007) 2160-3.
- 339 24. F. Faust, F. Kassie, S. Knasmüller, R.H. Boedecker, M. Mann, V. Mersch-
340 Sundermann, The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human
341 biomonitoring studies, *Mutat Res.* 566 (2004) 209-29.
- 342 25. A. Collins, M. Dusinska, M. Franklin, M. Somorovska, H. Petrovska, S. Duthie, L.
343 Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslova, N. Vaughan, Comet assay in human
344 biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ Mol Mutagen.*
345 30 (1997) 139-46.
- 346 26. D.J. Marlin, L. Johnson, D.A. Kingston, N.C. Smith, C.M. Deaton, S. Mann, P.
347 Heaton, F. Van Vugt, K. Saunders, J. Kydd, et al., Application of the comet assay
348 for investigation of oxidative DNA damage in equine peripheral blood mononuclear
349 cells, *J Nutr.* 134 (2004) 2133S-40S.
- 350 27. P.R. Heaton, R. Ransley, C.J. Charlton, S.J. Mann, J. Stevenson, B.H. Smith, J.M.
351 Rawlings, E.J. Harper, Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay
352 for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes, *J Nutr.* 132
353 (2002) 1598S-603S.
- 354 28. L. Cheng, L.E. Wang, M.R. Spitz, Q. Wei, Cryopreserving whole blood for
355 functional assays using viable lymphocytes in molecular epidemiology studies,
356 *Cancer Lett.* 166 (2001) 155-63.
- 357
- 358
- 359

360 **Figures legends**

361

362 **Figure 1** – Visual classification of DNA damage, according to the relative proportion of
363 DNA in the tail (scores 0–3), obtained by single-cell gel electrophoresis: 0 = 0-10%; I =
364 11-30%; II = 31-60%; III = >60% damage.

365

366 **Figure 2** – Correlation between endogenous DNA damage in lymphocytes isolated from
367 freshly blood and frozen whole blood (Pearson Correlation).

368

369 **Figure 3** – Measurements of DNA endogenous damage and DNA challenged with H₂O₂
370 (% damage) by Comet Assay in animals samples. Data are shown as mean ± sd.
371 *p<0.05 vs. DNA-stabilized tube and EDTA tube (ANOVA – Tukey Test).

372

373 **Figure 4** – Correlation between visual image analysis and computer image analysis
374 (Pearson Correlation).

375

376 **Figure 5** – Correlation between two independent examiners (Pearson Correlation).

377

378 **Figure 6** – Correlation using computer image analysis of 50 vs. 100 cells (Pearson
379 Correlation).

380

381

382

Figure(s)

Figure 1

Scores	0	I	II	III
% DNA in tail	0 – 10	11 – 30	31 – 60	> 60
Average	5	20	45	80
Tail length				

Figure 2

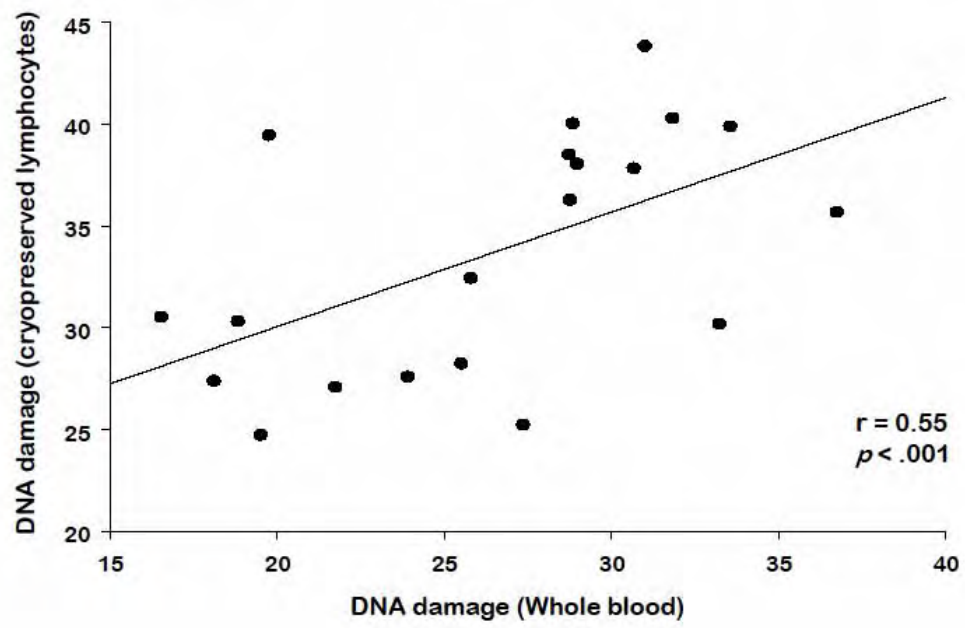


Figure 3

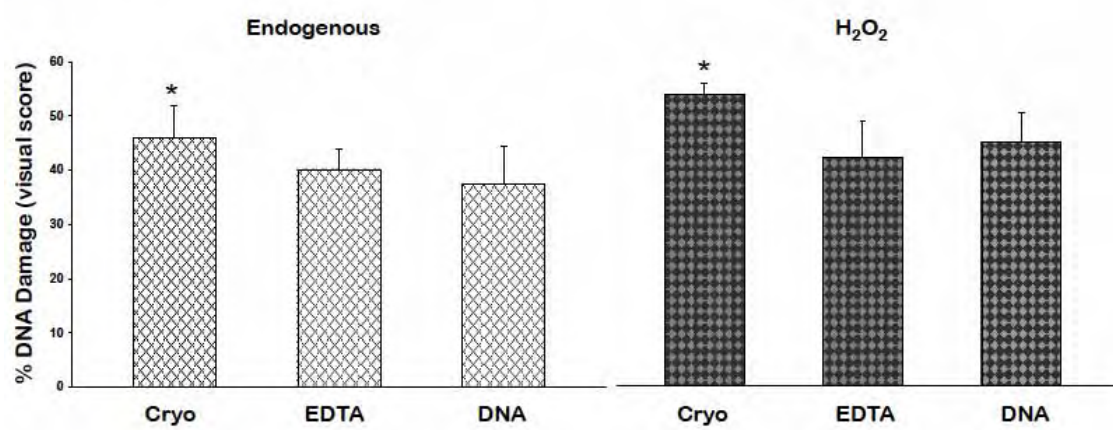


Figure 4

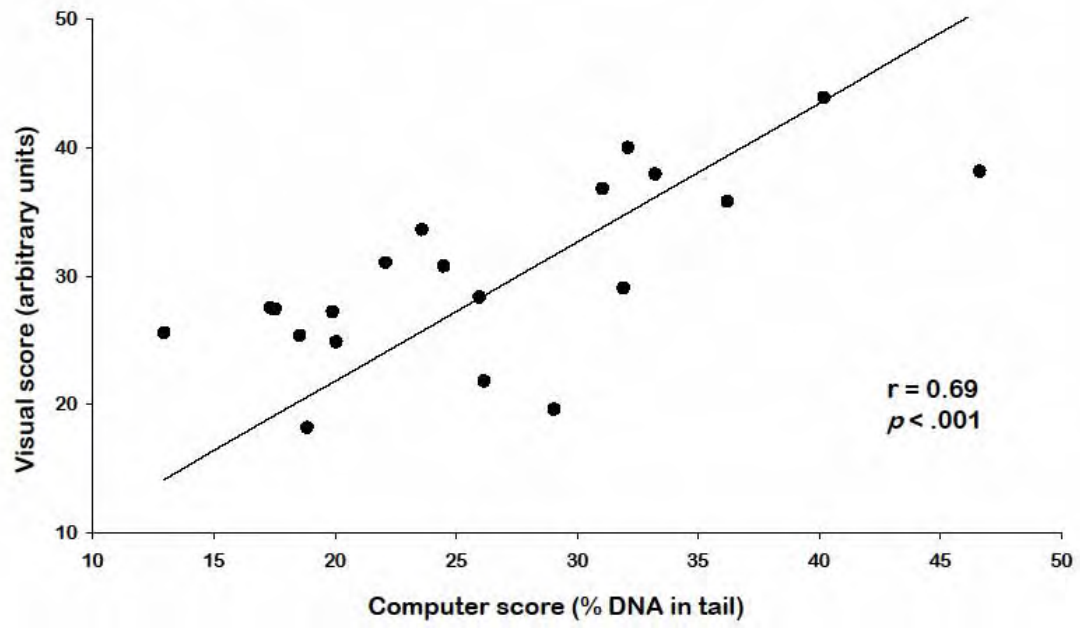


Figure 5

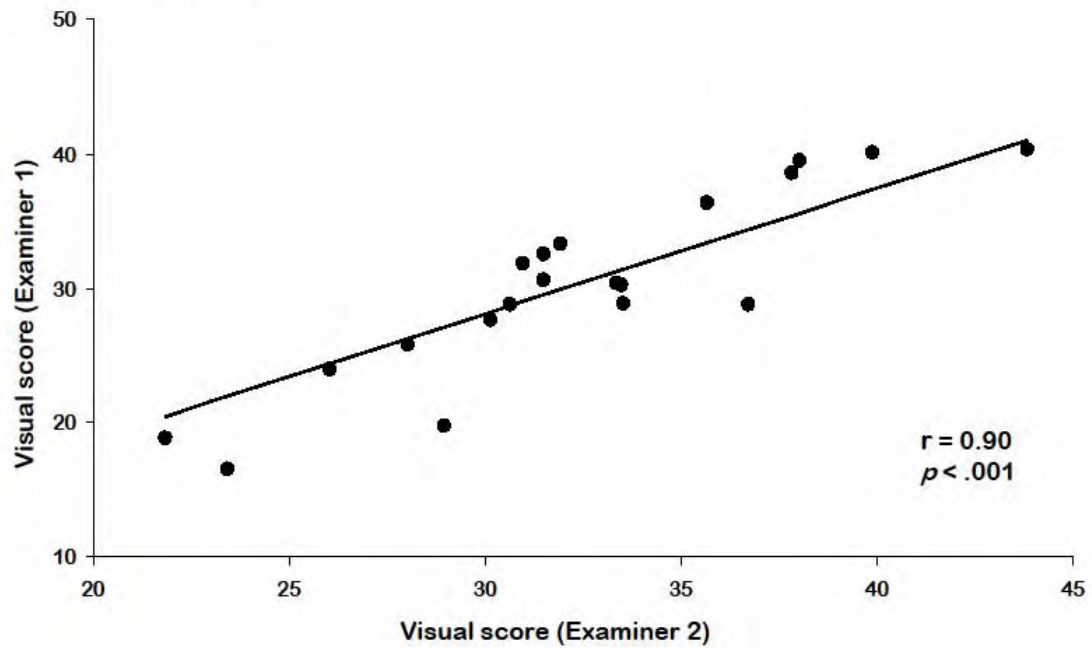


Figure 6

