UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Eduardo Klöppel

Vitamina D e cálcio para o tratamento de ratas prenhes com diabete moderado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Especialidade: Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu

2018

Eduardo Klöppel

Vitamina D e cálcio para o tratamento de ratas prenhes com diabete moderado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Especialidade: Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Klöppel, Eduardo.
Vitamina D e cálcio para o tratamento de ratas prenhes com diabete moderado / Eduardo Klöppel. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Débora Cristina Damasceno
Capes: 40101150

1. Diabetes mellitus. 2. Prenhez. 3. Vitamina D. 4. Cálcio. 5. Stress oxidativo. 6. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: diabete; estresse oxidativo; prenhez; ratas; vitamina D; cálcio.

EPÍGRAFE

“Não se conhece completamente uma ciência enquanto não se souber da sua história.”

(Auguste Comte)

DEDICATÓRIA

Ao **Jorge Luiz Trevisani (Moishe)**, *in memoriam*, por ter sido durante toda minha vida um grande líder, incentivador, amigo, e acima de tudo um exemplo. Embora não esteja mais entre nós, seu legado sempre será a seriedade, a honestidade, o bom caráter, a ética, a humildade, o trabalho e a confiança no Eterno como meios para a conquista do sucesso e do respeito. Dentro de cada conquista minha, sempre haverá um exemplo seu.
Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, **YHWH** (transliterado do hebraico - יהוה), por sua eterna misericórdia, e que apesar de eu não merecer, me concede todo o bem.

Aos meus familiares, meus pais **Sr. Agostinho Klöppel e Sra. Soraia da Silva,** meus irmãos **Caio Alex Klöppel** e **Murilo Klöppel** pelo apoio e por sempre desejarem o meu sucesso**.**

Aos meus amigos que sempre torcem por mim, **Andrieli Hauschildt, Beatriz Magalhães, Eric Trevisani, João Pedro Maia, Joelson Dantas, Juliana de Carvalho, Oto Schönholzer, Tatiele Schönholzer, Lucas Gabriel Venturini, Renato Henrique Ferreira, Rosa Jacinto Volpato** e **Thamires Ballarini Gratão.**

A **Aline Zanatta**, por todo carinho e paciência demonstrados durante todo esse período.

À toda a equipe do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina, especialmente ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pelo auxílio no cálculo do delineamento experimental e nas análises estatísticas do estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia e Faculdade de Medicina de Botucatu, pela oportunidade de realizar o experimento, realizar a dissertação e utilizar a estrutura da Instituição como um todo para minha formação.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em particular à secretária do Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, **Sra. Solange Sako**.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP, em especial à **Sra. Rosimeire Aparecida Vicente (Rose) e Sra. Rosângela Aparecida Lobo**, pela confecção da ficha catalográfica.

Aos assistentes de suporte acadêmico (ASA) da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente aos **Srs. Danilo Chaguri**, **Carlos Roberto Gonçalves de Lima, José Márcio Cândido (Ari) e Jurandir Antonio**, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia **Carolina Abreu Miranda, Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato, Franciane Quintanilha Gallego, Rafael Bottaro Gelaleti** e **Verônyca Gonçalves Paula** pela amizade, boa convivência e por toda a ajuda durante esses dois anos de mestrado.

A **Dra. Yuri Karen Sinzato** por todos os ensinamentos, paciência e também pelas críticas e broncas durante esses dois anos. Sem dúvidas você tem sido muito importante para a minha formação científica.

Aos participantes da banca de qualificação e de defesa da dissertação, **Profa Dra. Luciana Francisco Fleuri, Prof. Dr. Tiago Rodrigues** e **Prof. Dr. Kleber Eduardo Campos** pela disponibilidade, críticas e sugestões.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**, primeiramente pela confiança, mas também por toda paciência, pelos inúmeros ensinamentos e exemplo diário na liderança e condução de um grupo de pesquisa sério e comprometido. Muito obrigado por toda a valiosa e continua contribuição para a minha formação profissional e pessoal.

À CAPES pela concessão da bolsa, permitindo total dedicação a execução desse estudo.

Aos animais, que involuntariamente participaram desse estudo em prol da ciência.

EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM VITAMINA D E CÁLCIO SOBRE O CONTROLE GLICÊMICO E METABÓLICO, ESTRESSE OXIDATIVO E PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATAS PRENHES DIABÉTICAS

Kloppel E[1], Sinzato Y[1], Rodrigues T[3], Bueno A[1], Volpato GT[1,2], Damasceno DC[1*]

[1]Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

[2] Laboratório de Fisiologia e Toxicologia Reprodutiva, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Estado do Mato Grosso, Brasil.

[3] Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, Estado de São Paulo, Brasil.

***Correspondence to:** Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Distrito de Rubião Júnior, s/n

CEP. 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil

Fone/Fax: (55 14) 38801630

Email: damascenofmb@gmail.com

Esta dissertação foi apresentada na forma de artigo para ser submetido à publicação em periódico internacional.

RESUMO

Diabetes mellitus gestacional (DMG) aumenta o risco de complicações obstétricas, morbidade e mortalidade infantil. Os recém-nascidos podem apresentar macrossomia e, a longo prazo, alterações metabólicas. Além da insulina e de drogas hipoglicemiantes, os a terapia nutricional controlada também tem sido recomendada como tratamento para os portadores de diabete. Entretanto, o efeito da suplementação com vitaminas e minerais durante a gestação diabética não está bem descrito. Sendo assim, pretendemos analisar os efeitos da administração da vitamina D e de cálcio (Ca^{2+}) de forma associada (mistura) e isolada durante a prenhez de ratas com diabete. Para isso, ratas recém-nascidas receberam a droga beta-citotóxica (*streptozotocin*) para indução do diabete no dia do nascimento. Na vida adulta, essas ratas foram acasaladas e tratadas com vitamina D e/ou Ca^{2+} duas vezes por dia desde a confirmação da prenhez (dia 0) até o 20° dia de prenhez. No 17° dia, as ratas prenhes foram submetidas ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e, ao final da prenhez, foram anestesiadas e mortas para coleta de amostras de sangue e de fígado para avaliação do estado redox. Além disso, foi realizada a exposição dos cornos uterinos visando analisar o desempenho reprodutivo materno e o desenvolvimento embriofetal. As ratas diabéticas tratadas com a mistura apresentaram redução dos níveis glicêmicos nos tempos do TOTG, diminuição da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aumento nas porcentagens de recém-nascidos classificados como adequados para a idade de prenhez (AIP). Após análise de cada componente, testados isoladamente, foi verificado que a vitamina D também diminuiu os níveis glicêmicos no TOTG e TBARS, melhorou o desempenho reprodutivo materno e aumentou a taxa de fetos AIP. Entretanto, após o tratamento com Ca^{2+}, as ratas diabéticas não tiveram efeitos benéficos. A comparação entre o tratamento isolado com vitamina D e a mistura mostrou melhores resultados no controle glicêmico nas ratas diabéticas tratadas com a vitamina D isolada. Sendo assim, nossos resultados indicam um potencial efeito benéfico do uso da vitamina D em relação à hiperglicemia, estresse oxidativo e repercussões maternas e fetais, a fim de auxiliar o tratamento do diabete durante a gestação.

Palavras-chave: diabete, ratas, prenhez, vitamina D, cálcio, estresse oxidativo.

SUMÁRIO

DESTAQUES 9
INTRODUÇÃO 10
MATERIAIS E MÉTODO 12
RESULTADOS 22
DISCUSSÃO 33
AGRADECIMENTOS 36
DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE 36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38
ANEXOS 1 e 2 43

DESTAQUES

- A vitamina D melhorou a tolerância à glicose e reduziu a lipoperoxidação em ratas diabéticas.
- A vitamina D diminuiu as taxas de perdas embrionárias e fetais em ratas diabéticas.
- O Ca^{2+} isolado ou associado à vitamina D prejudicou a *performance* reprodutiva materna de ratas saudáveis.
- A vitamina D foi a responsável pelos resultados benéficos observados no organismo materno e no crescimento fetal.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizado por hiperglicemia, resultante da deficiência na síntese e/ou secreção de insulina pelas células beta (β)-pancreáticas, resistência à ação da insulina ou ambos. DM pode ser classificado como: *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) [1]. DM afeta cerca de 400 milhões de pessoas (7% da população mundial), dos quais 70% vivem em países com renda baixa e média [2,3].

Além da insulina e das drogas hipoglicemiantes empregadas como terapias farmacológicas para o tratamento do diabete, a nutrição controlada também é recomendada para pacientes diabéticos [4]. Entretanto, o efeito da suplementação com determinadas vitaminas e minerais durante a gravidez complicada pelo DMG ainda está sob investigação. A vitamina D é obtida principalmente pela exposição da pele à radiação solar ultravioleta B (UVB), o 7-deidrocolesterol (7-DHC), molécula derivada do colesterol localizada nas membranas celulares de camadas profundas da epiderme é convertido em colecalciferol (vitamina D3). Há evidências de que o cálcio (Ca^{2+}) e a vitamina D podem apresentar excelentes efeitos positivos no metabolismo da glicose e no controle metabólico durante a gestação [5–7] por estarem envolvidos no processo de secreção de insulina, o qual envolve a ação direta nas células β do pâncreas [8,9] e por apresentar papel protetor frente a condição de estresse oxidativo [10,11]. Entretanto, a deficiência desses micronutrientes pode alterar a função secretória das células β-pancreáticas, prejudicando a ação da insulina [12]. Essa deficiência também está relacionada à diminuição da fertilidade [13], piora do crescimento fetal e riscos aumentados do surgimento de DMG [14]. Esses prejuízos à saúde se correlacionam com os níveis baixos de vitamina D encontrados em pacientes com DMG [15].

Tendo em vista que a literatura aponta que os mecanismos epigenéticos, fatores nutricionais e estilo de vida sedentário afetam os riscos de complicações diabéticas de maneira diferente para os sexos masculino e feminino [16], há necessidade de mais pesquisas sobre os mecanismos fisiopatológicos do DM e as diferentes respostas existentes entre machos e fêmeas, contribuindo para um tratamento mais personalizado de forma sexo-específico. Devido a questões éticas envolvendo estudos em humanos, procedimentos invasivos e diversas variáveis não controláveis que alteram o ambiente intrauterino durante a investigação [17], modelos animais são utilizados para identificar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na síndrome diabética durante a prenhez e em sua prole. A fim de desenvolver modelos com animais de laboratório para simular a condição diabética, diferentes metodologias são empregadas, dentre

elas o uso de agentes β-citotóxicos (aloxana e *streptozotocin)* [18]. Visando reproduzir as glicemias do DM2 e/ou DMG humanos, modelos experimentais de diabete são desenvolvidos. Para isso, existem estudos que utilizam diferentes doses do agente β-citotóxico, vias de administração e períodos de vida do animal [19–24]. Em nosso laboratório, para esta indução, as ratas recebem a dose de 100 miligramas (mg) de *streptozotocin* por quilograma (kg) de peso corpóreo, a qual é administrada no primeiro dia de vida dos animais [25–29]. Na vida adulta, ao final da prenhez, essas ratas apresentam intolerância à glicose, estresse oxidativo [26,27], número reduzido de fetos vivos, aumento nas taxas de perdas embrionárias e redução na área de trocas materno-fetais na placenta [29].

Desta forma, frente ao exposto, a **hipótese** deste estudo é que a mistura de vitamina D e de Ca^{2+} contribuirá para reduzir as complicações maternas advindas do diabete, melhorando as repercussões materno-fetais. Além disso, ao testarmos os componentes da mistura de forma isolada, hipotetizamos que o tratamento materno com vitamina D apresentará resultados benéficos de forma mais significativa que o de Ca^{2+} tanto para o organismo materno quanto para o crescimento fetal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento com a mistura de vitamina D (colecalciferol) e/ou Ca^{2+} influencia na tolerância à glicose, peroxidação lipídica e no desempenho reprodutivo materno de ratas com diabete, além do crescimento fetal dessa prole. Foi analisado também de forma individualizada qual o constituinte da mistura apresenta maior benefício, visando compreender melhor os mecanismos envolvidos nesses resultados positivos.

MATERIAIS E MÉTODO

1. Animais e Materiais utilizados

1.1 Obtenção das ratas

Ratos (machos e fêmeas) da linhagem *Sprague Dawley* foram mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) sob condições controladas de temperatura (22±2°C), umidade (50±10%) e ciclo claro/escuro (12 horas). Água e ração (Purina®, Brasil) foram oferecidas *ad libitum*. Ratas adultas não diabéticas foram acasaladas com machos não diabéticos para obtenção de recém-nascidos do sexo feminino, que foram distribuídos para composição dos grupos experimentais diabético e não-diabético. Todos os procedimentos experimentais aplicados nesse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob os números de Protocolos 1158/2015 e 1205/2017 (Anexos 1 e 2).

1.2 Reagentes químicos utilizados

Todas as soluções foram preparadas usando escala analítica e com vidraria apropriada. Água purificada foi obtida do ultrapurificador da marca GEHAKA® Master System. Colecalciferol (pureza ≥98%), Glicerol fosfato de cálcio hidratado (pureza ≥96%), t-butil hidroperóxido (70% solução aquosa), cloreto de cálcio (CaCl2 - A.C.S.), 5,5-ditiobis (2-nitro-ácido benzoico) (DTNB – pureza ≥98%), ácido etilenediamino-tetraacético (EDTA - pureza ≥99%), glutationa redutase (GSH-Rd_100-300 unidades/mg proteina), L-glutationa reduzida (GSH – pureza 98%), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - A.C.S.), cloreto de magnésio ($MgCl_2$ - A.C.S.), 2-mercaptoetanol (pureza ≥99%), β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2′-fosfato reduzida (NADPH – pureza ≥93%), peroxidase (HRP) (25.000 unidades), vermelho de fenol, tampão fosfato (PBS – 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4); cianeto de potássio (pureza ≥97%), ferricianeto de potássio (pureza ≥99%), hidróxido de sódio (NaOH - pureza ≥97%), fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH2PO4.H2O A.C.S.), ácido sulfossalicílico (pureza ≥95%), ácido tiobarbitúrico (TBA - pureza ≥98%) e TRIS-Ultrapura TM (pureza ≥99.9%) foram adquiridas da Sigma-Aldrich®. Fosfafo de cálcio tribásico (FCC), ácido hidroclorídrico (HCl – A.C.S.) e ácido pirogálico (pureza ≥99.9%) foram adquiridos da Synth®. Álcool etílico (A.C.S.), fosfato de potássio trihidratado (K_2HPO_4 - pureza ≥99%) e bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$ - pureza ≥99.5%) foram adquiridos da Merck®. D-glicose anidra (dextrose - A.C.S.), cloreto de potássio (KCl - A.C.S.) e cloreto de sódio (NaCl - A.C.S.) foram adquiridos

da Vetec®. Fosfato de potássio (KH_2PO_4 - A.C.S.) e fosfato de sódio (Na_2HPO_4 - A.C.S.) foram adquiridos da Dinâmica®. Tiopental sódico (Thiopentax®) foi adquirido da Cristália®.

2. Período de diabetogênese - Indução do diabete

Para indução do diabete, ratas recém-nascidas receberam tampão citrato (grupo não-diabético) ou *streptozotocin* (STZ - SIGMA *Chemical Company, St. Louis*, MO, USA) diluído em tampão citrato (0,1 M; pH 4,5) na dose de 100 mg/kg no dia do nascimento por via subcutânea (grupo diabético) (Figura 1). Cinco dias após a indução do diabete, a glicemia foi mensurada em glicosímetro convencional (*One Touch Ultra – Johnson & Johnson*®). O critério de inclusão para as fêmeas que receberam tampão citrato foi glicemia ≤ 120 mg/dL e, para inclusão no grupo de diabete moderado, foi considerada glicemia ≥ 400 mg/dL para as fêmeas que receberam STZ [30].

3. Período de acasalamento

Aos 100 dias de vida, as ratas dos dois grupos experimentais foram submetidas ao acasalamento com duração máxima de 15 dias, que caracteriza pelo menos três ciclos estrais (Figura 1). No final da tarde, cada quatro ratas fêmeas e um macho não-diabético foram colocados juntos em gaiolas de polietileno até a obtenção do número de réplicas para cada grupo. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os esfregaços vaginais das ratas foram coletados para análise morfológica. O fator indicativo de prenhez foi a presença de espermatozoides e este foi considerado dia 0 de prenhez [31].

4. Grupos Experimentais

Após a confirmação do diagnóstico positivo de prenhez, as ratas foram colocadas em gaiolas individuais para o tratamento com vitamina D e com uma composição quelada de fosfato/glicerofosfato de Ca^{2+} de forma conjunta (mistura) na prenhez de ratas com relação à tolerância à glicose, lipoperoxidação materna, parâmetros reprodutivos maternos e ao crescimento fetal. Para isso, as ratas foram distribuídas em 4 grupos experimentais (n= 10 animais/grupo):

- *Grupo Não-diabético controle* (ND)– ratas não-diabéticas que receberam o veículo (água filtrada)

- *Grupo Não-diabético + mistura* (NDMix)– ratas não-diabéticas que receberam 500 µL da mistura contendo 15 mg/mL de fosfato de Ca^{2+} tribásico, 16 mg/mL de glicofosfato de Ca^{2+}; 0,025 mg/mL colecalciferol e 0,05 mg de fluoreto de sódio

- *Grupo Diabético controle* (Dmod)– ratas diabéticas que receberam água filtrada

- *Grupo Diabético + Mistura* (DmodMix)– ratas diabéticas que receberam 500 µL da mistura contendo 15 mg/mL de fosfato de Ca^{2+} tribásico, 16 mg/mL de glicofosfato de Ca^{2+}; 0,025 mg/mL colecalciferol e 0,05 mg de fluoreto de sódio.

No 17° dia de prenhez (mimetiza o período de 24ª a 28ª semana da gestação humana), as ratas passaram por jejum noturno e, em seguida, foram submetidas ao Teste Oral de Tolerância Oral à Glicose (TOTG) para verificar a influência do tratamento na tolerância à glicose das ratas. Ao final da prenhez (21° dia), as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax®) para obtenção de amostras de sangue para dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para avaliação do efeito do tratamento na lipoperoxidação, decorrente do estresse oxidativo causado pelo diabete. Para analisar se o tratamento com os micronutrientes influenciou na reprodução materna e no desenvolvimento embriofetal, foram retirados os ovários e os cornos uterinos das ratas já anestesiadas para contagem de parâmetros reprodutivos maternos a fim de se calcular as porcentagens de perdas pré e pós-implantação de embriões. Além disso, cada feto vivo foi retirado e pesado para classificação de seus pesos corpóreos em relação ao tempo de prenhez.

Após avaliação dos efeitos da mistura, foram analisados os efeitos de cada constituinte principal da mistura (vitamina D ou Ca^{2+}) na prenhez de ratas. Para isso, foram constituídos outros grupos experimentais, que foram distribuídos da seguinte forma (n= 10 animais/grupo):

- *Grupo Não-diabético controle* (ND)– ratas não-diabéticas que receberam o veículo (água filtrada - usado para o preparo de fosfato/glicerofosfato de Ca^{2+})

- *Grupo Não-diabético propilenoglicol* (NDProp)– ratas não-diabéticas que receberam o veículo (propilenoglicol - usado para o preparo da vitamina D)

- *Grupo Não-diabético + Vit D* (NDVitD)– ratas não-diabéticas que receberam 500 µL (0,5 mL)/dia de vitamina D na concentração de 0,025 mg/mL

- *Grupo Não-diabético + Ca^{2+}* ($NDCa^{2+}$) – ratas não-diabéticas que receberam 0,5 mL/dia de cálcio (15 mg/mL de fosfato de Ca^{2+} tribásico, 16 mg/mL de glicofosfato de Ca^{2+})

- *Grupo Diabético controle* (Dmod)– ratas diabéticas que receberam água filtrada

- *Grupo Diabético propilenoglicol* (DmodProp)– ratas diabéticas que receberam propilenoglicol.

- *Grupo Diabético + Vit D* (DmodVitD)– ratas diabéticas que receberam 0,5 mL/dia de vitamina D na concentração de 0,025 mg/mL.

- *Grupo Diabético + Ca^{+2}* ($DmodCa^{2+}$) – ratas diabéticas que receberam 0,5 mL/dia (15 mg/mL de fosfato de Ca^{2+} tribásico, 16 mg/mL de glicofosfato de Ca^{2+}).

De forma idêntica ao que foi realizado na análise da mistura, também foi avaliado o TOTG, a concentração de TBARS, perdas embrionárias e a classificação dos pesos corpóreos fetais do tratamento isolado. Para melhorar a compreensão dos efeitos do tratamento com vitamina D ou com Ca^{2+} de forma individualizada, as enzimas antioxidantes em hemácias lavadas e em amostras de fígado foram analisadas para complementar os resultados do quadro de estresse oxidativo materno, bem como na prole considerando as diferenças de gênero. Outros parâmetros reprodutivos maternos também foram avaliados visando completar o entendimento da *performance* reprodutiva. Pelo fato de muitos dos procedimentos realizados anteriormente no tratamento com vitamina D e Ca^{2+} associados serem semelhantes aos do experimento com as forma isoladas, a sequência experimental dos períodos de tratamentos e coleta das amostras foi desenvolvida e descrita abaixo de maneira integrada:

5. Período de Prenhez

5.1. Tratamento das ratas

Independentemente do tratamento com a mistura ou com os constituintes de forma isolada, as ratas foram tratadas por via intragástrica (*gavage*) duas vezes ao dia (manhã e tarde) durante toda a prenhez (do dia 0 ao 20° dia). O peso corpóreo de cada rata prenhe foi mensurado antes do tratamento e no último dia do tratamento.

5.2. Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG)

Para realizar o TOTG nos animais, foi realizado um jejum de seis horas. Em seguida, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa com agulha na extremidade distal da cauda de cada rata para determinação glicêmica (tempo zero). A gota de sangue foi depositada em glicofita que foi inserida em glicosímetro convencional para avaliação glicêmica e os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). Posteriormente, as ratas receberam

solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, foram determinadas as glicemias. Essas medidas glicêmicas também foram avaliadas para construção da curva glicêmica e para a estimativa da área total sob a curva (AUC- do inglês *area under curve*) usando matematicamente o método trapezoidal [32].

5.3. Prenhez a termo

5.3.1. Dados maternos

No 21° dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax®) seguida de decapitação para coleta de amostras de sangue da região do pescoço. Foi realizada laparotomia para retirada e exposição dos cornos uterinos para contagem dos sítios de implantação, reabsorção (morte embrionária), fetos vivos e mortos. A taxa de perda pré-implantação foi calculada por: Número (N°) de corpos lúteos – N° implantações/ N° corpos lúteos x 100. A taxa de perda pós-implantação foi determinada por: N° de implantações – N° de fetos vivos/ N° de implantações x 100. A taxa de viabilidade fetal foi determinada por: N° de fetos vivos / N° de implantações [31]. Os ovários também foram retirados para a contagem de corpos lúteos para avaliação indireta da ovulação.

5.3.2. Dados fetais

Após a retirada dos fetos, foi realizada a sexagem e pesagem individual. Os fetos e suas respectivas placentas foram pesados. A classificação dos pesos fetais foi realizada de acordo com a média ± desvio-padrão (DP) dos pesos corporais obtidos do grupo controle: recém-nascidos pequeno para idade de prenhez (PIP), cujo peso foi inferior à média – 1,7 x DP; adequado (AIP), aqueles cujo peso foi compreendido entre a média ± 1,7 x DP e grande para a idade de prenhez (GIP), cujo peso foi maior que a média + 1,7 x DP [33].

6. Preparo das amostras de sangue e tecido hepático

Parte das amostras de sangue foi coletada em tubos contendo anticoagulante (heparina) e outra parte em tubos secos no momento da morte dos animais. As amostras coletadas em tubos heparinizados foram processadas para obtenção de hemácias lavadas para dosagem dos biomarcadores de estresse oxidativo: concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de Grupos Tióis reduzidos (SH), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da atividade das enzimas antioxidantes glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase. As determinações foram realizadas em espectrofotômetro. As amostras de tecido hepático materno e fetal de ambos os

sexos foram pesadas e aliquotadas para preparo de homogenato e posterior determinação dos mesmos biomarcadores de estresse oxidativo avaliados no sangue materno.

6.1 Preparo dos homogenatos de fígado

6.1.1 Preparo dos homogenatos para dosagem de malondialdeído (MDA)

As alíquotas de fígado foram homogeneizadas em tampão RIPA 10% na proporção de 1/10 do peso de tecido em mg/volume de tampão em Ultra-Turrax®. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1600 x *g* por 10 min a 4ºC. O sobrenadante foi coletado para dosagens de proteínas totais e de MDA (um dos TBARS - marcador de lipoperoxidação).

6.1.2 Preparo dos homogenatos para dosagem de enzimas antioxidantes, grupos tióis reduzidos totais (Grupos SH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

As alíquotas de fígado foram homogeneizadas em tampão PBS 1x na proporção de 1/5 do peso de tecido em mg/volume de tampão em Ultra-Turrax®. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.500 x *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para dosagens de proteínas totais, catalase, GSH-Px, Grupos SH e H_2O_2.

7. Dosagens bioquímicas e dos marcadores de estresse oxidativo

Todas as dosagens de marcadores de estresse oxidativo foram realizadas em nosso laboratório a partir de modificações feitas na técnica de de Souza e colaboradores [34].

7.1 Hemoglobina (Hb)

As amostras de hemácias lavadas foram diluídas em uma solução contendo cianeto de potássio e ferricianeto de potássio (solução de Drabkin) na proporção de 2,5 microlitros (µL) e 197,5 µL, respectivamente. O ferricianeto de potássio converte a Hb em metahemoglobina, que é convertida para cianometahemoglobina (HiCN) com cianeto de potássio. A absorbância da solução foi então medida num espectrofotômetro em um comprimento de onda de 546 nanômetro (nm) usando um filtro verde amarelo. As absorbâncias foram multiplicadas pelo fator de correção obtido a partir da curva da hemoglobina padrão e os dados foram expressos em gramas por decilitro (g/dL). A determinação de hemoglobina foi utilizada como fator de referência para estimar as atividades enzimáticas de antioxidantes eritrocitários (GSH-Px e CAT) e concentrações de SH e de TBARS (Sinzato *et al*., 2018 - Dados não publicados).

7.2. Dosagem de proteínas totais

As dosagens de proteínas totais do fígado foram realizadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram diluídas na proporção de 1/60 em água destilada. Em seguida, foram pipetados 190 µL da solução de Bradford para 10 µL de amostra diluída em duplicata nas microplacas. Os cálculos foram obtidos a partir de uma curva padrão da solução de *Bovine serum albumin* (BSA) a 1 mg/mL e lidas em leitor de microplacas por espectrofotometria.

7.3. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação de TBARS é bem estabelecido para *screening* e monitoramento da lipoperoxidação. O método baseia-se na ligação do malondialdeído, produzido durante a lipoperoxidação, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), originando um produto cromóforo. Durante o processo analítico, 500 µL das amostras de hemácias lavadas foram misturadas a 500 µL de uma solução de ácido sulfossalicílico 3% para desproteinização. A solução foi centrifugada a 15.500 x *g* por 3 minutos a 4°C. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram misturados a uma solução de TBA 0,67% e incubadas a 80°C por 30 minutos, para que ocorresse a ligação do MDA ao cromógeno (reação colorimétrica). Após essa etapa, as amostras foram colocadas no gelo para parar a reação, seguido de leitura das amostras em leitor de microplacas com filtro de 535 nm. Os cálculos foram feitos baseando-se no coeficiente de extinção molar do TBARS e padronizando a concentração e a massa de hemoglobina utilizada na reação. Os valores foram mostrados como nanomolar de TBA por miligrama de hemoglobina na amostra (nM/mg de Hb) (Sinzato *et al*., 2018 - Dados não publicados).

7.4. Grupos tióis totais reduzidos (SH)

O ácido 5,5-ditiobis 2-nitro-benzoico (DTNB) reage com os grupos sulfidril (SH) de maneira proporcional à concentração dos tióis totais reduzidos presentes, apresentando uma substância cromófora de cor amarela. Nas etapas analíticas, foi pipetado 1 µL das amostras de hemácias lavadas em microplaca contendo 195 µL tampão TRIS/HCl 0,1M EDTA 0,5mM pH 8,0 em duplicata. Em seguida, foram adicionados 4 µL da solução de (DTNB) 10 mM e realizada a leitura das amostras em leitor de microplacas com filtro de 412 nm. Os cálculos foram feitos considerando o coeficiente de extinção molar da glutationa a 25°C, corrigido pela distância percorrida pela luz no espectrofotômetro e considerando a concentração e a massa de hemoglobina utilizada na reação. Os valores foram mostrados como milimolar de SH por

miligrama de hemoglobina ou proteínas totais na amostra (mM/mg de Hb ou PTN) (Sinzato *et al*., 2018 - Dados não publicados).

7.5. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O ensaio baseia-se na oxidação do vermelho de fenol (*phenol red*) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mediada pela peroxidase *horseradish* (HRP). Na presença de uma grande quantidade de H_2O_2, através da ação da HRP exógena, o vermelho de fenol muda sua coloração do vermelho para o amarelo. A adição de NaOH para a reação e eleva o pH para 12,5. A cor amarela torna-se púrpura e permanece inalterada por um longo período de tempo, permitindo a determinação das concentrações de H_2O_2 das amostras. Para o ensaio, 0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 11 mM K_2HPO_4, 8 mM Na_2HPO_4, 0,9 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM dextrose and *phenol red* 0,1 % foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura (Solução A); a peroxidase foi dissolvida em tampão fosfasto constituído por uma mistura de 0,1M K_2HPO_4 e 0,1M KH_2PO_4. Cada solução foi diluída em 150 mL de água ultrapura. Então, 100 mL da solução de 0,1M K_2HPO_4 foi titulada com 0,1M KH_2PO_4 até atingir pH 7,0. Durante a etapa de reação, foram pipetados 5 µL de hemácias lavadas em 105 µL da solução contendo *phenol red* e peroxidase em microplaca de fundo chato. Após 10 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados 10µL de NaOH 1M com a finalidade de parar a reação, seguido de leitura a 620 nm. Para os cálculos, foi considerado o coeficiente de extinção molar da curva padrão do H_2O_2 a 37°C (0,0296 $\mu M^{-1}/cm^{-1}$). Os valores foram expressos como micromolar de H_2O_2 por miligrama de hemoglobina ou proteínas totais (µM/mg de Hb ou PTN) (Sinzato *et al*., 2018- Dados não publicados).

7.6. Catalase

A catalase é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. A atividade da catalase foi mensurada pela diferença entre a absorbância final e inicial, por uma unidade de tempo estabelecida. Foram adicionados aproximadamente 980 µL de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 em uma cubeta de quartzo, então 1 µL de amostra foi adicionado a essa cubeta. O aparelho foi zerado seguido da adição de aproximadamente 20 µL de uma solução de H_2O_2 1M (concentração final de H_2O_2 de 20 mM). Foram medidas as absorbâncias em um intervalo delta de 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro. O delta obtido foi usado no cálculo da atividade da catalase, basendo-se na constante de estabilidade do H_2O_2. Os dados obtidos foram expressos como atividade da catalase em mM/min/mg de Hb ou proteínas totais (Sinzato *et al*., 2018 - Dados não publicados

7.7. Glutationa Peroxidade (GSH-Px)

A enzima glutationa peroxidase catalisa a reação de peróxidos com a GSH. Foram pipetados 100µL de Tampão TRIS/HCl 50mM EDTA 5mM pH 7,6 em microplacas com poços identificados. Então foram usados 0,5µL de amostras de hemácias lavadas e 50µL da solução contendo GSH 0,1M, GSH-Rd 10U/mL e NADPH 4mM. Em seguida, foram adicionados 20µL de t-Butil Hidroperóxido 7mM em cada poço e realizada a cinética por 5 min com intervalos de 1 min a 25ºC em leitor de microplacas com filtro de 340nm. Para os cálculos das atividades, foi usada a média dos deltas obtidos em cada amostra divididos pelo coeficiente de extinção molar do NADPH a 25°C, considerando a massa de hemoglobina usada na reação. A atividade da GSH-Px foi expressa em mM/min/mg de Hb ou proteínas totais (Sinzato *et al*., 2018- Dados não publicados).

7.8. Malondialdeído (MDA) em tecido hepático

Assim como o TBARS, o MDA é importante para o para *screening* e monitoramento da lipoperoxidação. Em um tubo Falcon foram adicionados 100 µL de SDS 8,1% e 100 µL de amostra. Depois foram misturados com 4 mL de uma solução de TBA 5,3% pH 3,5 em NaOH 0,1M e ácido acético glacial diluído a 20%. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-Maria a 96ºC por 60 minutos. Após essa etapa, as amostras foram colocadas no gelo para cessar a reação, seguido de leitura das amostras em leitor de microplacas com filtro de 535 nm. Os cálculos foram realizados com ajuda de um gráfico de dispersão a partir da curva padrão montada com uma solução estoque de MDA 125 µM. Na concentração final, foi considerada também a massa de proteína usada na reação. Os valores foram expressos como nanomolar por mg de proteína total (nM/mg de PTN) (Sinzato *et al*., 2017b).

8. Cálculo do delineamento experimental e análise estatística

Considerando uma variabilidade residual de 0,8 gramas (referente ao peso corpóreo de cada recém-nascido), poder de 90% e confiabilidade de 95%, o tamanho amostral mínimo foi de 10 ratas por grupo. Respeitando que a homogeneidade entre as unidades experimentais é um dos conceitos básicos de um projeto experimental e considerando que um grupo ND e DmodMix, DmodVitD ou DmodCa^{2+} são organismos biologicamente diferentes, foi realizada a comparação dentro dos grupos não-diabéticos e dentro dos grupos Dmod. Para confirmar o quadro de diabete após a indução com a droga beta-citotóxica, foi realizada a comparação entre ND x Dmod. Para as comparações entre TBARS, médias glicêmicas no TOTG e nos cálculos da AUC entre os grupos no experimento da mistura, foi empregado o teste de Distribuição

Gama pelo fato de não haver normalidade entre as variáveis estudadas. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para comparações entre os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo em hemácias lavadas. As comparações dos números de corpos lúteos, implantações, fetos vivos e reabsorções (mortes embrionárias) entre os grupos experimentais foram realizadas com uso do teste da Distribuição de Poisson. Para os dados de proporções, como as porcentagens de perdas embrionárias antes e após a implantação (perdas pré e pós) e classificação de pesos corpóreos, foi empregado o teste Exato de Fisher. O ganho de peso corpóreo e o peso total da ninhada durante o período de prenhez foi comparado entre os grupos experimentais pelo teste de Distribuição Normal.

Os dados obtidos foram apresentados como média e desvio-padrão, porcentagens e erro padrão da média, os quais foram analisados com a ajuda de Bioestatístico do Escritório de Apoio à Pesquisa de nossa Instituição. Para todas as comparações estatísticas, foi considerado limite mínimo de significância de 5% ($p<0,05$).

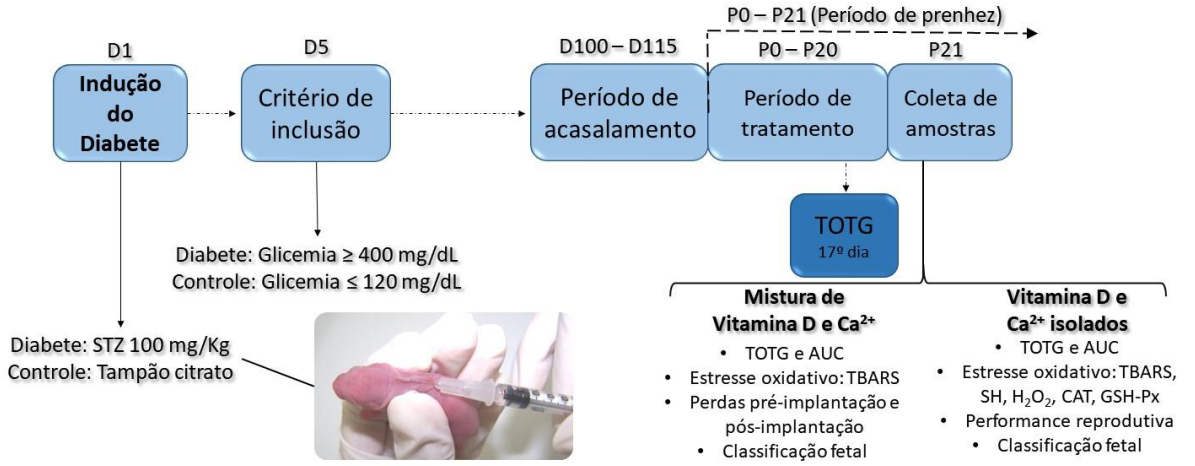


Figura 1. **Sequência experimental (indução do diabete, período de acasalamento, prenhez/tratamento das ratas e coleta/dosagens das amostras).**

Legenda: STZ - *streptozotocin*; D – dia de vida; P – dia de prenhez; TOTG – teste oral de tolerância à glicose; AUC – área sob a curva; TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; SH -Grupos tióis reduzidos; H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio; CAT – catalase; GSH-Px – glutationa peroxidase.

RESULTADOS

Tratamento com a mistura de vitamina D e Ca^{2+}

Comparação entre os grupos de ratas não-diabéticas

A Figura 2 (A e B) apresenta os níveis glicêmicos do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e área sob a curva (AUC). Não houve diferenças estatisticamente significativas em ambos os parâmetros entre os grupos ND e NDMix. O mesmo ocorreu com relação às concentrações de TBARS (Figura 2C). Quanto à avaliação do desempenho reprodutivo materno, o tratamento com a mistura de vitamina D e Ca^{2+} causou um aumento nas taxas de perdas pré-implantação (Figura 2D). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos com relação à classificação dos pesos corpóreos dos fetos como pequenos (PIP), adequados (AIP) ou grandes para a idade de prenhez (GIP) (Figura 2E).

Comparação entre os grupos de ratas não-diabéticas e diabéticas não tratadas

O grupo diabético apresentou maiores níveis glicêmicos durante os tempos 30’ e 60’ do TOTG e na AUC, maiores concentrações de TBARS e índices aumentados de perdas pré e pós-implantação embrionária, além de maior porcentagem de fetos classificados como PIP e GIP e menor de fetos AIP quando comparado às ratas ND (Figuras 2A-E).

Comparação entre os grupos de ratas diabéticas

O tratamento com a mistura causou uma diminuição das concentrações glicêmicas no tempo 30’ do TOTG e diminuiu os valores glicêmicos nos cálculos da AUC quando comparados aos do grupo Dmod (Figuras 2A e B). A mistura também diminuiu a peroxidação de lipídios e as taxas de perdas pré e pós-implantação embrionárias. A vitamina D também causou um aumento das taxas de fetos classificados como AIP e diminuição de fetos PIP (Figuras 2C-E).

Tratamento com a vitamina D e Ca^{2+} isolados

As variáveis analisadas dos animais tratados com os veículos (água e propilenoglicol) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Por isso, os animais foram agrupados e constituíram os grupos não-diabéticos (ND) e diabéticos (Dmod).

Comparação entre os grupos de ratas não-diabéticas

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias glicêmicas no TOTG e na avaliação da AUC (Figuras 3A e 3B), concentração de TBARS, grupos SH e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além da atividade das enzimas antioxidantes glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase em hemácias lavadas (Figuras 4A-E) entre os grupos ND, NDVitD e NDCa^{2+}. Com relação ao desempenho reprodutivo, as ratas do grupo NDCa^{2+} tiveram um aumento significativo do número de perdas antes da implantação dos embriões (pré-implantação embrionária) e diminuição da eficiência placentária quando comparadas às das ratas do grupo ND. As ratas dos grupos NDVitD e NDCa^{2+} tiveram diminuição nas porcentagens de fetos classificados como AIP e aumento nas taxas de fetos GIP quando comparados aos das ratas ND. O peso placentário foi menor no grupo NDVitD e maior no grupo NDCa^{2+} quando comparados ao grupo ND (Tabela 1). As ratas mães e suas recém-nascidas fêmeas apresentaram um aumento estatisticamente significativo dos grupos tióis reduzidos (SH) hepáticos nos grupos tratados com vitamina D e Ca^{2+} quando comparadas as do grupo não tratado (Figuras 5B e 6B). Já os ratos machos recém-nascidos apresentaram diminuição da concentração de MDA hepático no grupo NDVvitD comparado ao ND (Figura 7A). Com relação aos demais biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de ratas e seus recém-nascidos, não houve diferença estatisticamente significante entre nenhum dos grupos não-diabéticos comparados (Figuras 5-7).

Comparação entre os grupos de ratas não-diabéticas e diabéticas sem tratamento

Com relação ao TOTG, houve aumento dos níveis glicêmicos nos tempos 30’ e 60’ nas ratas do grupo Dmod em relação aos mesmos tempos analisados no grupo ND (Figura 3A). As ratas do grupo Dmod também apresentaram aumento nos valores glicêmicos da AUC quando comparados aos do grupo ND (Figura 3B). As concentrações de TBARS no sangue foram aumentadas nas ratas do grupo Dmod (Figura 4A-E). Quanto aos parâmetros reprodutivos maternos, houve aumento estatisticamente significativo no número de reabsorções (mortes embrionárias), perdas pré e pós-implantação, diminuição no número de fetos vivos, menor ganho de peso materno durante a prenhez e menor peso da ninhada no grupo Dmod (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos diabéticos e não-diabéticos com relação aos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de ratas e seus recém-nascidos (Figuras 5-7).

Comparação entre os grupos de ratas diabéticas

As ratas do grupo DmodVitD apresentaram diminuição das glicemias no tempo 30’ no TOTG em relação às glicemias neste mesmo tempo das ratas Dmod (Figura 3A). Os valores glicêmicos na AUC foram menores no grupo DmodVitD quando comparados aos dos outros dois grupos diabéticos (Figura 3B).

As concentrações dos biomarcadores de estresse oxidativo em hemácias lavadas são mostrados nas Figuras 4A-E. O tratamento com vitamina D diminuiu as concentrações de TBARS nas ratas diabéticas quando comparadas às das ratas diabéticas sem tratamento. Os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas quanto às concentrações de grupos SH, níveis de H_2O_2 e nas atividades das enzimas antioxidantes GSH-Px e CAT.

A tabela 1 ilustra os efeitos do tratamento com vitamina D ou Ca^{2+} sobre o desempenho reprodutivo materno e parâmetros fetais de ratas diabéticas. O tratamento com vitamina D diminuiu o número de reabsorções (mortes embrionárias), taxas de perda pós-implantação embrionária e reduziu a porcentagens de fetos classificados como PIP, aumentando os fetos classificados como AIP quando comparados ao grupo Dmod. Os grupos tióis reduzidos (SH) no fígado tiveram um aumento estatisticamente significativo nos grupos tratados com vitamina D e Ca^{2+} quando comparadas as do grupo não tratado nas ratas mães e suas recém-nascidas do sexo feminino (Figuras 5B e 6B). Já os ratos machos recém-nascidos apresentaram aumento da atividade de GSH-Px no grupo diabético tratado com vitamina D (7E). Com relação aos demais parâmetros avaliados no fígado de ratos, as outras figuras apresentadas demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as ratas dos grupos diabéticos tratados e não tratados e em seus descendentes (Figuras 5-7).

Mistura *versus* vitamina da isolada

As Figuras 8A-C apresentam as comparações realizadas entre os grupos tratados com a mistura e com a vitamina D, que foi o constituinte que apresentou efeito benéfico no Experimento 2. As ratas não-diabéticas e diabéticas dos grupos tratados com a mistura ou com vitamina D não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si quanto aos níveis glicêmicos durante o TOTG e nas concentrações de TBARS. Entretanto, como já mostrado, ambos os grupos apresentaram menores níveis glicêmicos quando comparados ao grupo diabético nos tempos 30’ do TOTG e na AUC. Os níveis glicêmicos da AUC foram maiores nos grupos NDMix e DmodMix em relação aos grupos NDVitD e DmodVitD, respectivamente.

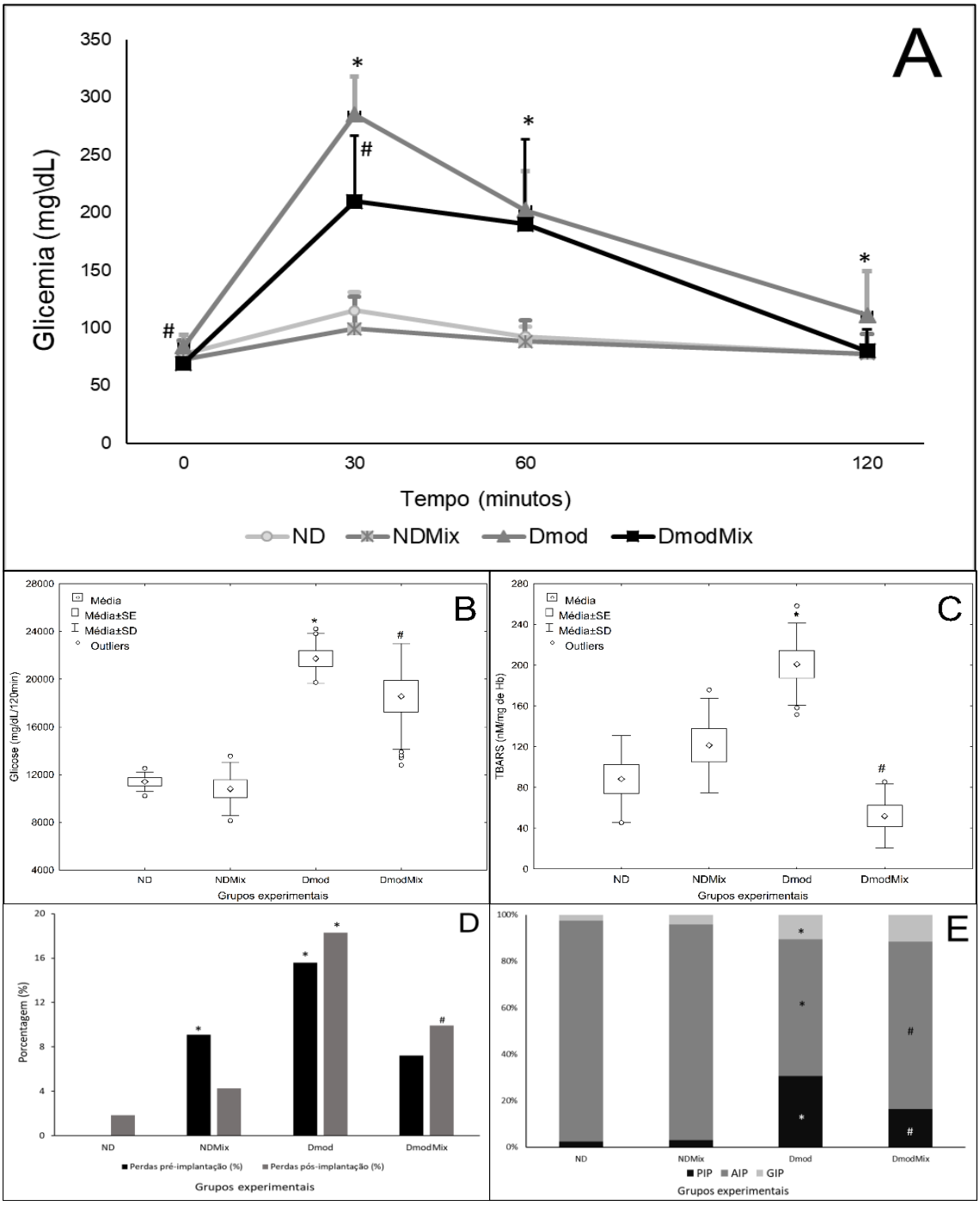


Figura 2: Efeito do tratamento com a mistura de vitamina D e Ca2+ sobre os **A-** Níveis glicêmicos apresentados durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) **B-** Área sob a curva (AUC); **C-** Concentração de TBARS; **D -** Porcentagem de perdas pré-implantação e pós-implantação embrionárias, **E-** Porcentagem de fetos classificados como pequenos (PIP), adequados (AIP) ou grandes (GIP) para a idade de prenhez de ratas não-diabéticas (ND) e diabéticas (Dmod) tratadas com veículo ou com a mistura (Mix).

Valores expressos como média ± desvio padrão ou porcentagem (%).

*p<0,05 – Grupo Dmod comparado ao grupo ND; #p<0,05 - comparado ao grupo Dmod (teste de Distribuição Gama para TOTG, AUC e TBARS e Teste Exato de Fisher para analises de proporções).

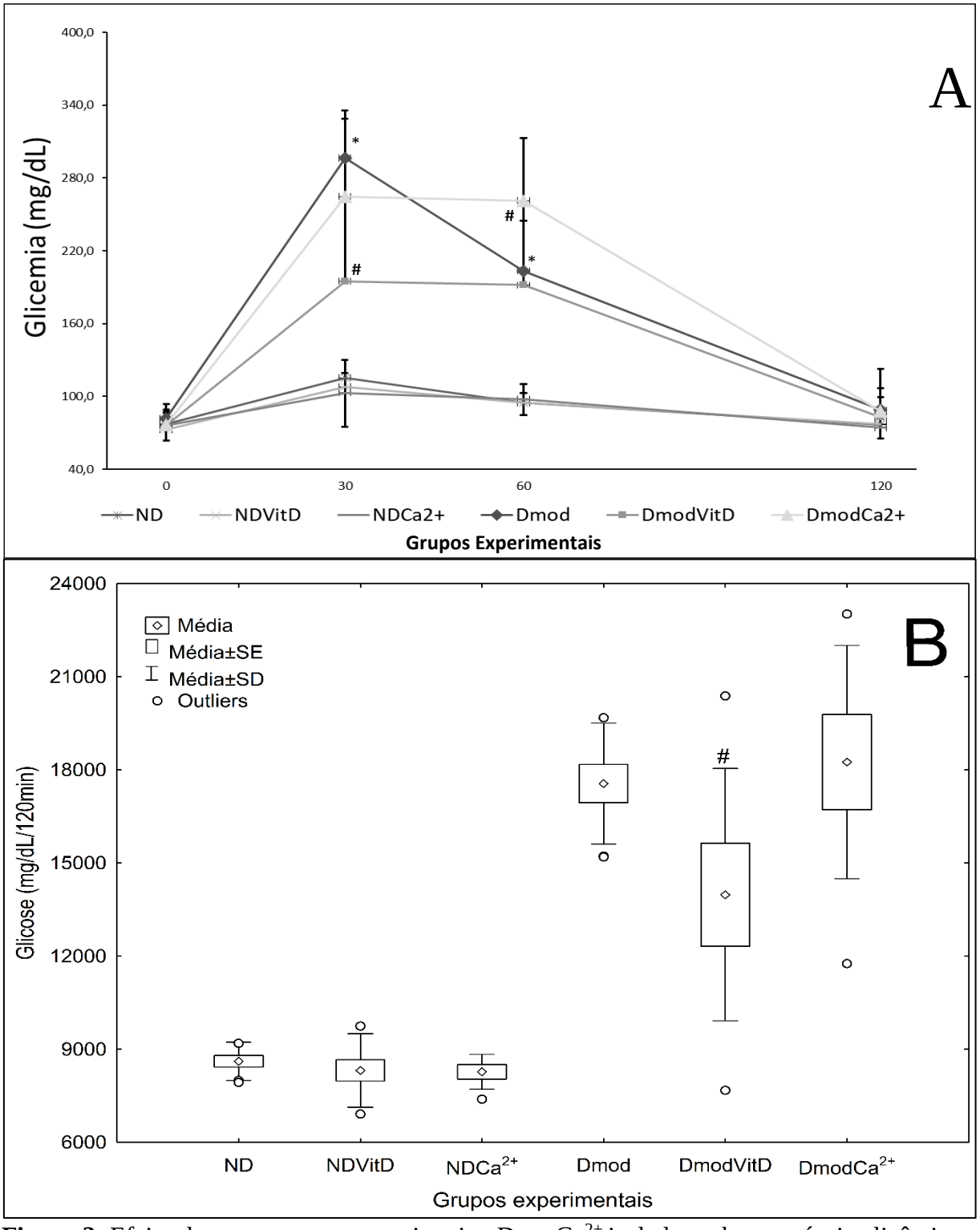


Figura 3: Efeito do tratamento com a vitamina D ou Ca^{2+} isolados sobre os níveis glicêmicos apresentados durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e na área sob a curva (AUC) de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, vitamina D ou Ca^{2+}.

Valores expressos como média ± desvio padrão (Figura de linhas, box plott) e média ± erro padrão (SE) e *outliers* (box plott)

*p<0,05 – Grupo Dmod comparado ao grupo ND; #p<0,05 - comparado ao grupo Dmod (teste de Distribuição Gama)

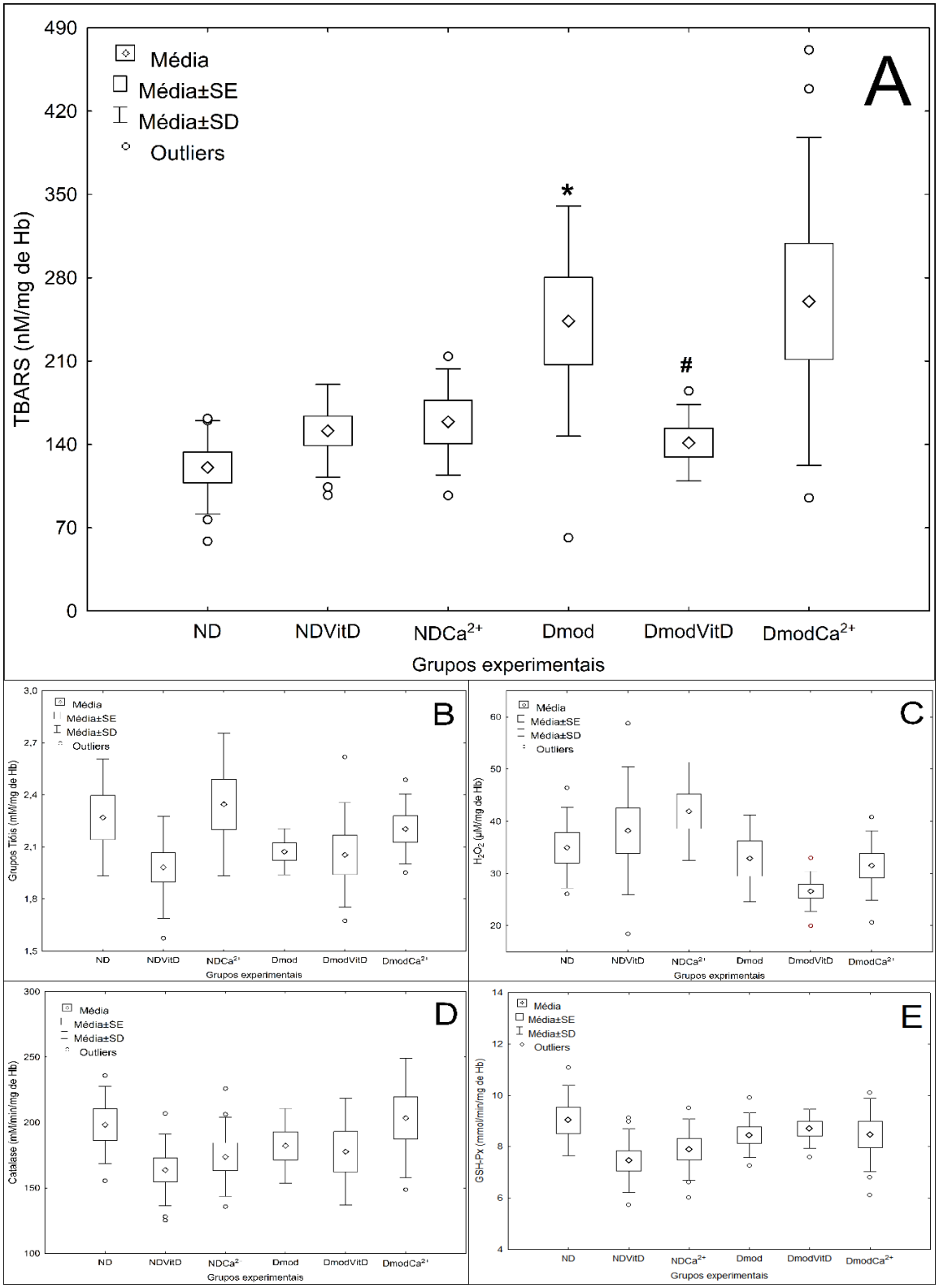


Figura 4: Efeito do tratamento com a vitamina D ou Ca2+ isolados sobre os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo: **A**- Concentração de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); **B**- Concentração de grupos Tióis totais **C**- Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); **D**- Atividade enzimática da Catalase; **E**- Atividade enzimática da glutationa peroxidase (GSH-Px) em hemácias lavadas de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, vitamina D ou Ca^{2+}.
Valores expressos como média ± desvio padrão, média ± erro padrão (SE) e *outliers.*
*p<0,05 -Grupo Dmod comparado ao grupo ND; #p<0,05 - comparado ao grupo Dmod (Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

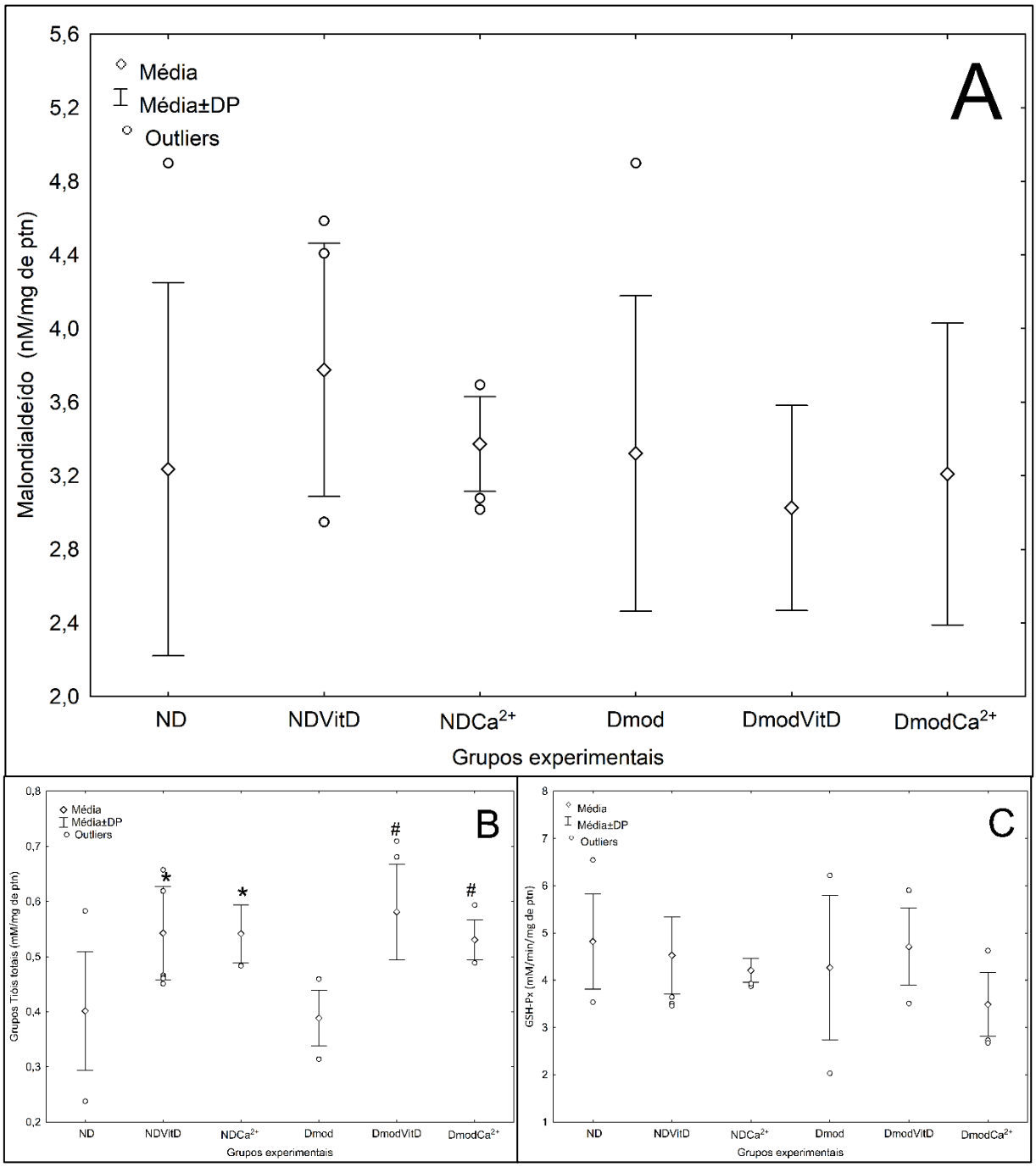


Figura 5: Efeito do tratamento com a vitamina D ou Ca2+ isolados sobre os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo: **A**-Malondialdeído; **B**- Concentração de grupos Tióis totais; C-Atividade enzimática da glutationa peroxidase (GSH-Px) em homogenato do fígado de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, vitamina D ou Ca^{2+}.

Valores expressos como média ± desvio padrão, média ± erro padrão (SE) e *outliers.*

*p<0,05 -Grupo Dmod comparado ao grupo ND; #p<0,05 - comparado ao grupo Dmod (Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

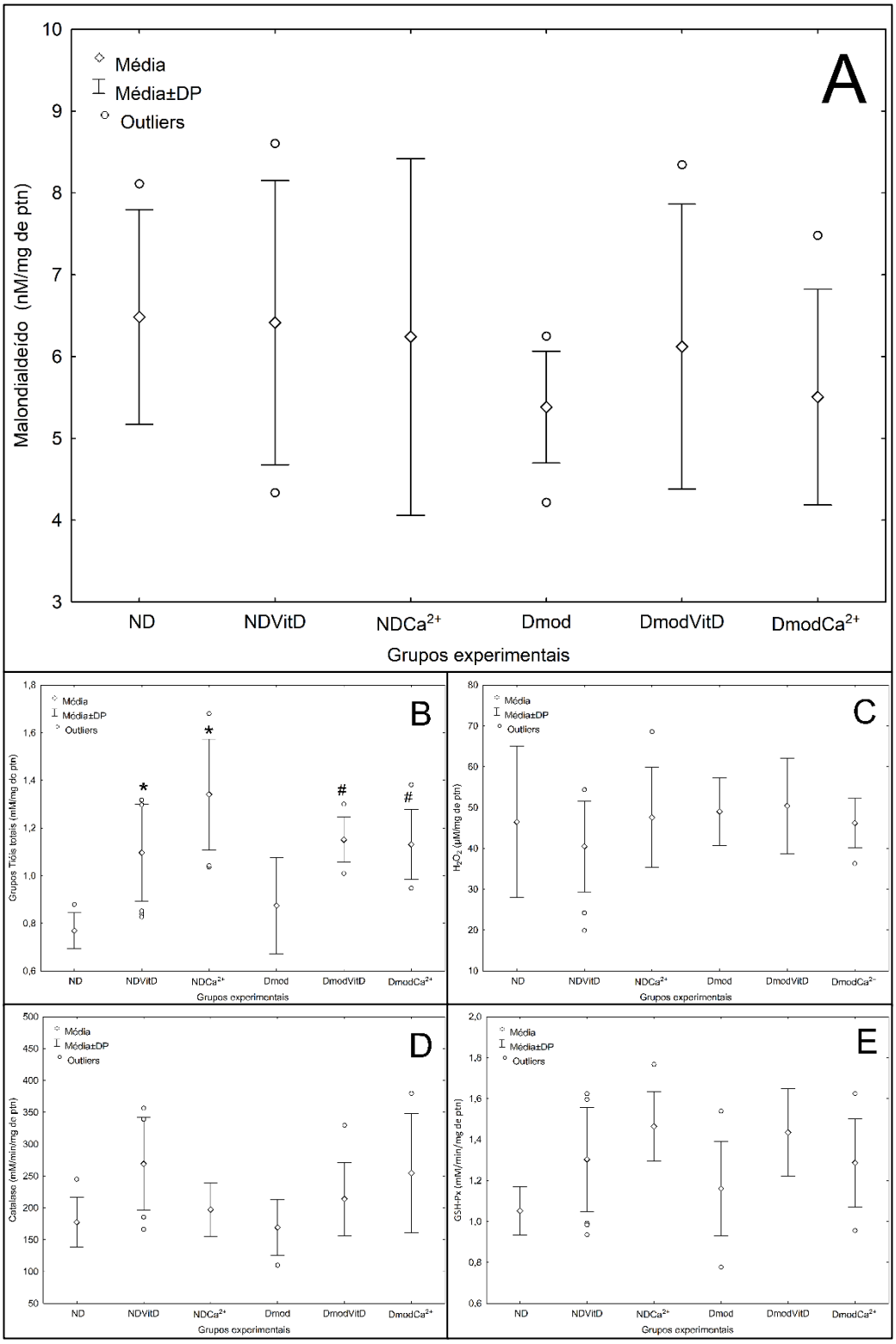


Figura 6: Efeito do tratamento com a vitamina D ou Ca2+ isolados sobre os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo: **A**-Malondialdeído; **B**- Concentração de grupos Tióis totais; **C**- Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); **D**- Atividade enzimática da Catalase; **E**-Atividade enzimática da glutationa peroxidase (GSH-Px) em homogenatos do fígado de fêmeas filhas de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, vitamina D ou Ca^{2+}.

Valores expressos como média ± desvio padrão, média ± erro padrão (SE) e *outliers.*

*p<0,05 -Grupo Dmod comparado ao grupo ND; #p<0,05 - comparado ao grupo Dmod (Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

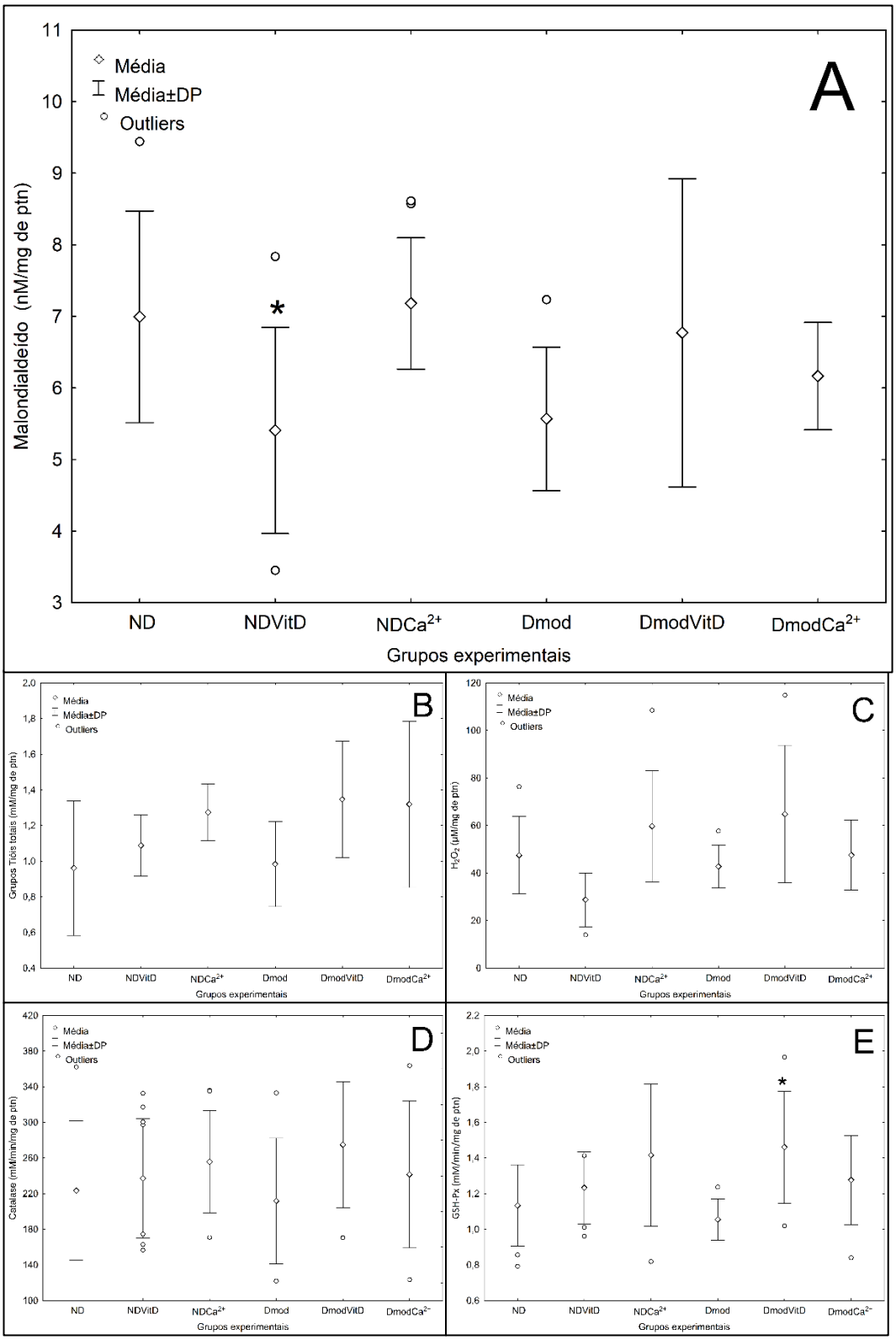


Figura 7: Efeito do tratamento com a vitamina D ou Ca2+ isolados sobre os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo: **A**-Malondialdeído; **B**- Concentração de grupos Tióis totais; **C**- Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); **D**- Atividade enzimática da Catalase; **E**-Atividade enzimática da glutationa peroxidase (GSH-Px) em homogenatos do fígado de machos filhos de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, vitamina D ou Ca^{2+}.

Valores expressos como média ± desvio padrão, média ± erro padrão (SE) e *outliers.*

*p<0,05 -Grupo Dmod comparado ao grupo ND; #p<0,05 - comparado ao grupo Dmod (Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

Tabela 1. Efeito do tratamento com a vitamina D ou Ca^{2+} isolados sobre o desempenho reprodutivo de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, vitamina D ou Ca^{2+}.

	Grupos					
	ND	**NDVitD**	**NDCa^{2+}**	**Dmod**	**DmodVitD**	**DmodCa^{2+}**
Ratas prenhes a termo (n)	10	13	08	17	07	08
Corpos lúteos						
Total (n)	141	160	105	249	76	105
Média ± DP	14,1±2,4	12,3±3,04	13,1±2,17	14,6±2,18	10,9±5,9	13,1±2,6
Implantações						
Total (n)	133	149	91	204	67	83
Média ± DP	13,3±3,0	11,5±2,9	11,4±3,0	12,0±3,6	9,6±5,2	10,4±3,9
Fetos vivos						
Total (n)	131	139	86	172	66	68
Média ± DP	13,1±3,2	10,7±2,8	10,7±3,2	10,1±3,4*	9,4±5,4	8,5±4,4
Reabsorções						
Total (n)	02	10	05	32	01	15
Média ± DP	0,2±0,4	0,8±0,8	0,6±0,7	1,88±2,0*	0,1±0,4$^{\#}$	1,88±1,5
Perdas Pré (%)	5,7	6,9	13,3*	17,3*	11,8	20,9
Perdas Pós (%)	1,5	6,7	5,5	14,0*	1,5$^{\#}$	18,1
Ganho de peso materno (g)						
Média ± DP	132,6±31,9	111,8±22,2*	105,8±20,8*	109,7±23,6*	93,6±31,4	102,7±16,5
eso da ninhada (g)						
Média ± DP	92,9±21,1	78,0±20,9	81,3±19,9	72,0±23,9*	68,0±38,2	62,3±30,6
Peso dos fetos (g)						
Média ± DP	5,4±0,4	5,5±0,5	5,5±0,5	5,3±0,8	5,4±0,5	5,3±0,7
% PIP	3,8	7,3	7,1	23,7*	6,2$^{\#}$	16,2
% AIP	93,8	77,4*	80,9*	63,7*	85,9$^{\#}$	67,6
% GIP	2,3	15,3*	11,9*	12,6*	7,81	16,2
Peso Placentas (g)						
Média ± DP	0,5±0,08	0,5±0,10*	0,6±0,13*	0,5±0,10	0,5±0,09	0,6±0,09

Valores apresentados como média ± desvio padrão (DP) ou porcentagem (%), sendo n = número
*p<0,05 – Grupo Dmod comparado ao grupo ND; $^{\#}$p<0,05 - comparado ao grupo Dmod.
(Teste Exato de Fisher para classificação fetal, Distribuição normal para ganho de peso corpóreo e peso total da ninhada e Distribuição de Poisson para demais parâmetros).
Legenda: Pequeno para a idade de prenhez (PIP); adequado para a idade de prenhez (AIP); grande para a idade de prenhez (GIP)

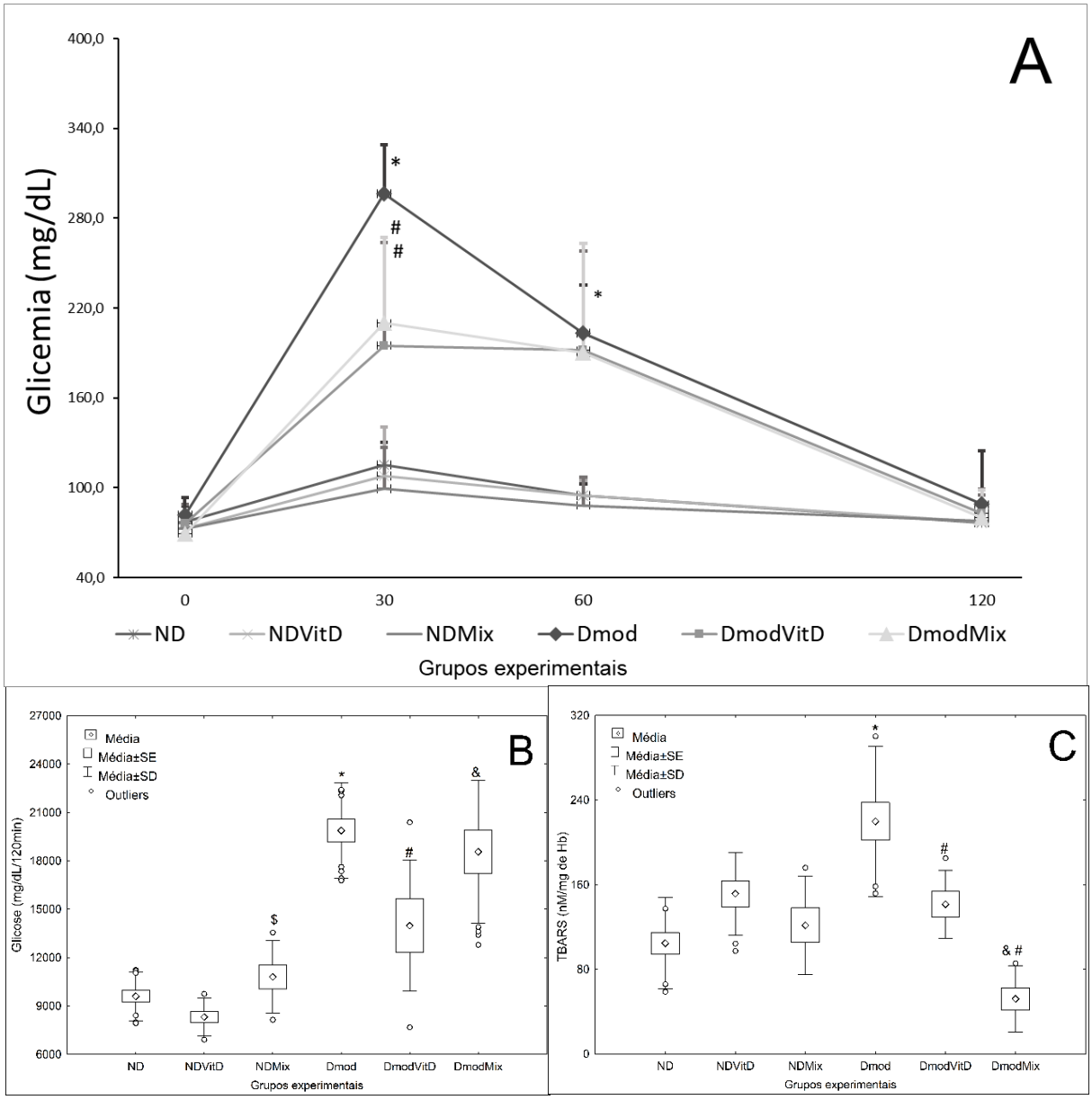


Figura 8: Comparação estatística entre os resultados positivos/benéficos encontrados no tratamento com a mistura e no tratamento com a vitamina D isolada com relação aos **A-** Níveis glicêmicos apresentados durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG); **B-** Área sob a curva (AUC); **C**- Concentração de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com veículo, Vitamina D ou a mistura (vitamina D e Ca^{2+}). Valores expressos como média ± desvio padrão (Figura de linha e para box plott) e média ± erro padrão (SE) e *outliers* (box plott).

*p<0,05 – Grupo Dmod comparado ao grupo ND; $^{\#}$p<0,05 - comparado ao grupo Dmod; $^{\$}$p<0,05 comparado ao grupo NDVitD; $^{\&}$p<0,05 comparado ao grupo DmodVitD (Teste de Distribuição Gama para TOTG e AUC e Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para TBARS).

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi verificar se o tratamento com vitamina D, associado ou não ao cálcio, leva a benefícios no organismo materno prejudicado pelo diabete e, com isso contribui para o crescimento e desenvolvimento embriofetal. Frente aos resultados obtidos no presente estudo, foi demonstrado que a vitamina D apresenta um efeito protetor no organismo materno porque diminuiu a intolerância à glicose, a lipoperoxidação e perdas embrionárias e fetais. Além disso, causou melhora no crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos.

As ratas com diabete induzido quimicamente por *streptozotocin* apresentaram hiperglicemia frente à sobrecarga de glicose no TOTG, levando consequentemente à maior disponibilidade de glicose na corrente sanguínea por minuto (AUC aumentada) durante a prenhez. Além disso, essas ratas diabéticas apresentaram alterações metabólicas com relação ao aumento da lipoperoxidação, além da piora no desempenho reprodutivo materno e no desenvolvimento embriofetal. Outros estudos já demonstraram que o diabete moderado compromete o desempenho reprodutivo materno e o crescimento embriofetal [26,35,36]

Nossos achados confirmaram que a associação de vitamina D e de Ca^{2+} foi positiva para o controle glicêmico e para a diminuição do estresse oxidativo nos grupos diabéticos. Porém, o tratamento com a mistura causou um aumento de perdas pré-implantação em ratas saudáveis, indicando um possível efeito tóxico do tratamento. Sendo assim, foi necessário avaliar o principal responsável pelos efeitos existentes com o uso da mistura. Para isso, o tratamento com vitamina D e com cálcio foi analisado de maneira isolada. Os tratamentos isolados mostraram que o Ca^{2+} foi o responsável pelo aumento de perdas de embriões antes da implantação, indicando um papel prejudicial deste composto à rata-mãe durante o processo de fixação dos embriões no organismo materno. Os mecanismos envolvidos nesse processo não são totalmente descritos na literatura, mas acredita-se que o excesso de Ca^{2+} intracelular diminui a função mitocondrial dos embriões em estágios iniciais do desenvolvimento, o que pode estar relacionado com a incapacidade desses embriões em regular os níveis de Ca^{2+} intracelular, impossibilitando o desenvolvimento desses embriões [37].

Nossos resultados sobre o uso de vitamina D mostrou benefícios quanto ao controle glicêmico, tolerância à glicose e à redução da lipoperoxidação em ratas diabéticas. Estes dados comprovaram que os benefícios da mistura ocorreram em decorrência da vitamina D. Além disso, pelo fato dos níveis glicêmicos estarem diminuídos aos 30 minutos do TOTG, sugere-se que o tratamento com vitamina D esteja relacionado ao aumento da sensibilidade dos tecidos

periféricos à insulina ou ao aumento da secreção de insulina. Nossos achados corroboram estudo de Cade & Norman (1986) [38], que demonstraram que ratos machos com depleção de vitamina D na dieta apresentaram intolerância à glicose e que, após a suplementação com esta vitamina, os animais tiveram restauração da tolerância à glicose e aumento da secreção de insulina. Para explicar os mecanismos pelos quais a vitamina D age na restauração da tolerância à glicose e no aumento da sensibilidade à insulina, autores sugerem que a vitamina D se ligue a seus receptores VDR nas células β-pancreáticas [38–41], melhorando as vias de sinalização do cálcio através da alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e inositol trifosfato (IP3), com o aumento na síntese e secreção de insulina nestas células [42,43]. Além disso, a vitamina D poderia agir no influxo de Ca^{2+} para aumento da secreção de insulina, sendo que o mecanismo proposto é a ação rápida e não genômica exercida pela vitamina D no VDR de membrana do pâncreas, uma vez que os canais rápidos Ca^{2+} voltagem-dependentes da membrana plasmática (MP) e do retículo endoplasmático (RE) são ativados, levando ao aumento do influxo de Ca^{2+}, secreção de insulina (Figura 7A-7B) [44] e da expressão de GLUT2 nas células β do pâncreas [41]. Adicionalmente, Maestro *et al.* (2000) [45] demonstraram que a vitamina D também é capaz de estimular a expressão gênica dos receptores de insulina (IR – do inglês *insulin receptor*) em células humanas que foram mantidas em meio de cultura, possivelmente por mecanismos transcricionais envolvendo o RNAm de IR e de VDR localizados próximos às regiões promotoras desses genes, aumentando a sensibilidade e o transporte de glicose. Com relação a uma possível ação periférica da vitamina D associada à captação de glicose, Xavier e colaboradores (2012) [46] evidenciaram que animais com diabete induzido por *streptozotocin* apresentaram redução dos níveis glicêmicos a partir do décimo dia de tratamento com vitamina D e, ao final do tratamento (15 dias), foi verificado aumento na expressão gênica e proteica do IR no tecido muscular. No entanto esses autores não propuseram o mecanismo envolvido na ação da vitamina D neste tecido. Outros autores utilizando diferentes tipos de análises metodológicas e com diferentes níveis séricos de vitamina D verificaram que o receptor de vitamina D não está presente em músculo liso, esquelético e cardíaco [47,48], sugerindo que a vitamina D não age diretamente nos tecidos periféricos.

O diabete está diretamente relacionado à presença de peroxidação lipídica/lipoperoxidação [49]. Nos eritrócitos, a vitamina D foi capaz de diminuir a lipoperoxidação causada pelo diabete e essa melhora pode estar associada à redução das concentrações glicêmicas e ao efeito direto desta vitamina como antioxidante de membrana. Isso pode ser explicado pela interação dos anéis hidrofóbicos da vitamina D com a membrana, inibindo a peroxidação lipídica dependente de íons ferro [50]. Embora não houvesse mudanças

significativas quanto aos outros biomarcadores de estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes entre os grupos experimentais, a redução glicêmica causada pelo tratamento com a vitamina D e sua ação direta como agente antioxidante podem ter sido suficientes para diminuir a produção de lipoperóxidos.

Os níveis glicêmicos aumentados das mães diabéticas não foram suficientes para causar lipoperoxidação no tecido hepático, diferentemente do observado em eritrócitos. As análises de biomarcadores de estresse oxidativo no tecido hepático materno mostraram que o tratamento com vitamina D e/ou Ca^{2+} não interferiram nestes marcadores, exceto pelo aumento observado nas concentrações de grupos tióis reduzidos em ambos grupos diabéticos e não diabéticos. Este aumento também foi observado nas recém-nascidas do sexo feminino. No entanto, os filhotes do sexo masculino apresentaram um aumento da atividade de GSH-Px, mostrando diferentes respostas entre os sexos durante o desenvolvimento fetal. Sugere-se que o aumento da atividade de GSH-Px levou ao maior consumo de grupos tióis reduzidos, o que não foi observado nas mães e recém-nascidas fêmeas.

Frente às alterações glicêmicas decorrentes do diabete, as ratas apresentaram aumento das perdas embrionárias e fetais. Esses dados experimentais reproduzem os encontrados na clínica em pacientes com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), que apresentam alterações reprodutivas maternas e no crescimento fetal [51–53]. Após o tratamento com vitamina D, houve melhora na performance reprodutiva desses animais verificado pela redução do número de mortes embrionárias (reabsorções) e nas taxas de perdas pré e pós-implantação, chegando aos mesmos valores de ratas saudáveis. Além disso, foi verificado aumento no número de fetos nascidos com peso corpóreo adequado para a idade de prenhez (AIP) e diminuição de fetos pequenos para a idade de prenhez (PIP). Existem poucos estudos na literatura investigando o tratamento com vitamina D em ratas diabéticas prenhes.

Embora exista escassez de resultados que avaliem os efeitos da vitamina D no desempenho reprodutivo de ratas diabéticas, alguns estudos clínicos e experimentais mostram uma super expressão de VDR placentário (Figura 7A) [54–56]. Com base na literatura sobre esse aumento da expressão de VDR na placenta de animais diabéticos e em outro estudo que mostra o aumento da secreção de lactogênio placentário (PL) promovido pela vitamina D na gestação [57], sugerimos que o tratamento com vitamina D associado à super expressão de VDR em ratas diabéticas promoveu o aumento do PL, que por sua vez contribui para o aumento da secreção de insulina [58]. Isso, consequentemente, levou à diminuição dos níveis glicêmicos observados em nosso estudo. Além disso, Lacroix *et al.* [59] demonstraram uma relação inversa entre o hormônio do crescimento placentário (PGH) e o nível glicêmico. Desta forma, a maior

taxa de AIP encontrados em nosso estudo pode estar relacionada com à diminuição dos níveis glicêmicos e, consequentemente, com um possível aumento dos níveis do PGH, contribuindo para o crescimento fetal adequado após o tratamento das mães com vitamina D.

Portanto, nossos resultados demonstraram que a vitamina D, além de influenciar positivamente no controle glicêmico e na diminuição da lipoperoxidação, foi benéfica durante a prenhez de ratas diabéticas, melhorando os índices de desempenho reprodutivo e desenvolvimento e crescimento fetal. Por sua vez, o Ca^{2+} isolado parece não ter sido eficiente nestes mesmos parâmetros, além de ter prejudicado o processo de implantação embrionária em ratas saudáveis. Estes resultados sugerem que a vitamina D isolada pode ser a alternativa mais indicada para diminuir os efeitos do diabete durante a gestação. Porém, mais estudos precisam ser realizados a fim de compreender os mecanismos pelos quais o desempenho reprodutivo materno e desenvolvimento embriofetal foram protegidos pela ação direta ou indireta da vitamina D.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Ms Carolina Abreu Miranda e à Ms Franciane Quintanilha Gallego Souza por todo o suporte e ajuda no desenvolvimento da parte experimental deste estudo, ao Sr. Danilo Chaguri pelo apoio técnico e cuidado dos animais, ao Prof. Dr. Tiago Rodrigues pela doação dos micronutrientes, ao EAP da Faculdade de Medicina/Unesp, especialmente ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, pelas análises estatísticas e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver quaisquer conflitos de interesse.

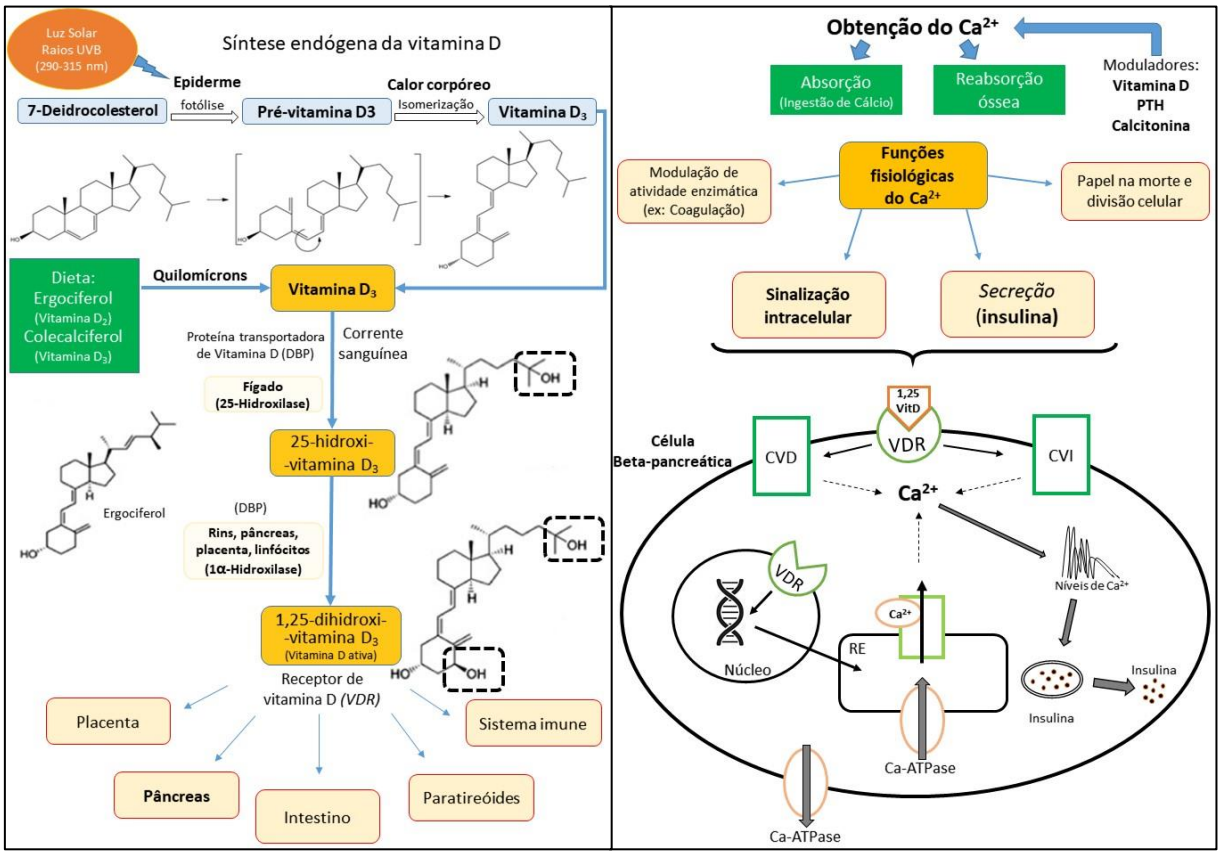


Figura 7: A – Esquema da obtenção/síntese, metabolização, ativação e ação da vitamina nos tecidos alvo; **B** – Obtenção do cálcio e interação com a ação da vitamina D na célula β-pancreática no estímulo para a síntese/secreção de insulina (adaptado de Sergeev, 2016).

Legenda: VDR: Receptor de vitamina D; CVD – canal de cálcio voltagem-dependente; CVI – canal de cálcio voltagem independente; 1,25 VitD – Vitamina D ativa; Ca-ATPase – bombas de cálcio dependentes de ATP; RE – Retículo endoplasmático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] American Diabetes Association, Classification and ciagnosis of ciabetes, Diabetes Care. 40 (2017) S11–S24. doi:10.2337/dc17-S005.

[2] American Diabetes Association, 4. Lifestyle Management., Diabetes Care. 40 (2017) S33–S43. doi:10.2337/dc17-S007.

[3] IDF, IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation. (2015) 1–163. doi:10.1289/image.ehp.v119.i03.

[4] D.C. Volume, Standards of Medical Care in Diabetes—2017 : Summary of Revisions, Diabetes Care. 40 (2017) S4–S5. doi:10.2337/dc17-S003.

[5] Z. Asemi, M. Karamali, A. Esmaillzadeh, Effects of calcium-vitamin D co-supplementation on glycaemic control, inflammation and oxidative stress in gestational diabetes: A randomised placebo-controlled trial, Diabetologia. 57 (2014) 1798–1806. doi:10.1007/s00125-014-3293-x.

[6] M. Karamali, Z. Asemi, M. Ahmadi-Dastjerdi, A. Esmaillzadeh, Calcium plus Vitamin D supplementation affects pregnancy outcomes in gestational diabetes: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial, Public Health Nutrition. 19 (2016) 156–163. doi:10.1017/S1368980015000609.

[7] Q. Zhang, Y. Cheng, M. He, T. Li, Z. Ma, H. Cheng, Effect of various doses of vitamin D supplementation on pregnant women with gestational diabetes mellitus: A randomized controlled trial, Experimental and Therapeutic Medicine. 12 (2016) 1889–1895. doi:10.3892/etm.2016.3515.

[8] C.J. Rosen, J.S. Adams, D.D. Bikle, D.M. Black, M.B. Demay, J.A.E. Manson, M.H. Murad, C.S. Kovacs, The nonskeletal effects of vitamin D: An endocrine society scientific statement, Endocrine Reviews. 33 (2012) 456–492. doi:10.1210/er.2012-1000.

[9] P.M. Bourlon, A. Faure-Dussert, B. Billaudel, Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat, British Journal of Pharmacology. 121 (1997) 751–758. doi:10.1038/sj.bjp.0701204.

[10] M. Bhat, A. Ismail, Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 152 (2015) 171–179. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.05.012.

[11] F. Foroozanfard, M. Jamilian, F. Bahmani, R. Talaee, N. Talaee, T. Hashemi, K. Nasri, Z. Asemi, A. Esmaillzadeh, Calcium plus vitamin D supplementation influences biomarkers of inflammation and oxidative stress in overweight and vitamin D-deficient women with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial, Clinical Endocrinology. 83 (2015) 888–894. doi:10.1111/cen.12840.

[12] K.A. Al-Shoumer, T.M. Al-Essa, Is there a relationship between vitamin D with insulin resistance and diabetes mellitus?, World Journal of Diabetes. 6 (2015) 1057–64. doi:10.4239/wjd.v6.i8.1057.

[13] A. Nandi, N. Sinha, E. Ong, H. Sonmez, L. Poretsky, Is there a role for vitamin D in human reproduction?, Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. 25 (2016) 15–28. doi:10.1515/hmbci-2015-0051.

[14] S.-Q. Wei, H.-P. Qi, Z.-C. Luo, W.D. Fraser, Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis, The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal

Medicine. 26 (2013) 889–899. doi:10.3109/14767058.2013.765849.

[15] S. Soheilykhah, M. Mojibian, M. Rashidi, S. Rahimi-Saghand, F. Jafari, Maternal Vitamin D Status in Gestational Diabetes Mellitus, Nutrition in Clinical Practice. 25 (2010) 524–527. doi:10.1177/0884533610379851.

[16] A. Kautzky-Willer, J. Harreiter, G. Pacini, Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus., Endocrine Reviews. 37 (2016) 278–316. doi:10.1210/er.2015-1137.

[17] I. López-Soldado, E. Herrera, Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring, Experimental Diabesity Research. 4 (2003) 107–118. doi:10.1155/EDR.2003.107.

[18] D.T. Ward, S.K. Yau, A.P. Mee, E.B. Mawer, C.A. Miller, H.O. Garland, D. Riccardi, Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes., Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 12 (2001) 779–790. http://jasn.asnjournals.org/content/12/4/779.full.pdf (accessed January 23, 2018).

[19] B. Portha, C. Levacher, L. Picon, G. Rosselin, Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period, Diabetes. 23 (1974) 889–895. doi:10.2337/diab.23.11.889.

[20] K. Tsuji, T. Taminato, M. Usami, H. Ishida, N. Kitano, H. Fukumoto, G. Koh, T. Kurose, Y. Yamada, H. Yano, Y. Seino, H. Imura, Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model, Metabolism. 37 (1988) 1040–1044. doi:10.1016/0026-0495(88)90064-9.

[21] H. MERZOUK, S. MADANI, D. CHABANE SARI, J. PROST, M. BOUCHENAK, J. BELLEVILLE, Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes, Clinical Science. 98 (2000) 21. doi:10.1042/CS19990109.

[22] Y.K. Sinzato, P.H.O. Lima, K.E. de Campos, A.C.I. Kiss, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats., Revista Da Associação Médica Brasileira (1992). 55 (2009) 384–8. doi:10.1590/S0104-42302009000400010.

[23] A. Jawerbaum, V. White, Animal models in diabetes and pregnancy, Endocrine Reviews. 31 (2010) 680–701. doi:10.1210/er.2009-0038.

[24] D.C. Damasceno, A.C.I. Kiss, Y.K. Sinzato, K.E. De Campos, M.V.C. Rudge, I.M.P. Calderon, G.T. Volpato, Maternal-fetal outcome, lipid profile and oxidative stress of diabetic rats neonatally exposed to streptozotocin, Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes. 119 (2011) 408–413. doi:10.1055/s-0030-1269886.

[25] D.C. Damasceno, Y.K. Sinzato, A. Bueno, A.O. Netto, B. Dallaqua, F.Q. Gallego, I.L. Iessi, S.B. Corvino, R.G. Serrano, G. Marini, F. Piculo, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions, Journal of Diabetes Research. 2013 (2013) 473575. doi:10.1155/2013/473575.

[26] B. Dallaqua, F.H. Saito, T. Rodrigues, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, E. Herrera, D.C. Damasceno, Treatment with Azadirachta indica in diabetic pregnant rats: Negative effects on maternal outcome, Journal of Ethnopharmacology. 143 (2012) 805–811. doi:10.1016/j.jep.2012.07.023.

[27] B. Dallaqua, F.H. Saito, T. Rodrigues, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, G.T. Volpato, D.C. Damasceno, Azadirachta indica treatment on the congenital malformations of fetuses from rats,

Journal of Ethnopharmacology. 150 (2013) 1109–1113. doi:10.1016/j.jep.2013.10.046.

[28] P.H. Lima, Y. Sinzato, R. Gelaleti, I.M. Calderon, M.V. Rudge, D. Damasceno, Genotoxicity Evaluation in Severe or Mild Diabetic Pregnancy in Laboratory Animals, Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 120 (2012) 303–307. doi:10.1055/s-0031-1299766.

[29] Y.K. Sinzato, G.T. Volpato, I.L. Iessi, A. Bueno, I. de M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters, Experimental Diabetes Research. 2012 (2012) 108163. doi:10.1155/2012/108163.

[30] T.M.M. Santos, Y.K. Sinzato, F.Q. Gallego, I.L. Iessi, G.T. Volpato, B. Dallaqua, D.C. Damasceno, Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats, Cell Stress and Chaperones. 20 (2015) 595–603. doi:10.1007/s12192-015-0581-4.

[31] F.J.R. Damasceno, D. C., Kempinas, W. G., Volpato, G. T., Consoni, M., Rudge, M. V. C., & Paumgartten, Anomalias congênitas: estudos experimentais, Belo Horizonte: Coopmed. (2008).

[32] M.M. Tai, A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves, Diabetes Care. 17 (1994) 152–154. doi:10.2337/diacare.17.2.152.

[33] N.A. Soulimane-Mokhtari, B. Guermouche, A. Yessoufou, M. Saker, K. Moutairou, A. Hichami, H. Merzouk, N.A. Khan, Modulation of lipid metabolism by n −3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring, Clinical Science. 109 (2005) 287–295. doi:10.1042/CS20050028.

[34] M.D.S.S. De Souza, Y.K. Sinzato, P.H.O. Lima, I.M.P. Calderon, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno, Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke, Reproductive BioMedicine Online. 20 (2010) 547–552. doi:10.1016/j.rbmo.2010.01.002.

[35] L. Bequer, T. Gómez, J.L. Molina, A. Álvarez, C. Chaviano, S. Clapés, Experimental diabetes impairs maternal reproductive performance in pregnant Wistar rats and their offspring, Systems Biology in Reproductive Medicine. (2017) 1–11. doi:10.1080/19396368.2017.1395928.

[36] A.C.I. Kiss, B. Woodside, Y.K. Sinzato, M.M. Bernardi, W. De Grava Kempinas, J.A. Anselmo-Franci, D.C. Damasceno, Neonatally induced mild diabetes: influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats., Diabetology & Metabolic Syndrome. 5 (2013) 61. doi:10.1186/1758-5996-5-61.

[37] M. Lane, B.D. Bavister, Calcium homeostasis in early hamster preimplantation embryos., Biology of Reproduction. 59 (1998) 1000–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746754 (accessed April 18, 2018).

[38] C. Cade, A.W. Norman, Vitamin d3 improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin d-deficient rat in vivo, Endocrinology. 119 (1986) 84–90. doi:10.1210/endo-119-1-84.

[39] S. Lee, A. Clark, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Pancreatic beta-Cell Function: Vitamin D Receptors, Gene Expression, Insulin Secretion, Endocrinology. 134 (1994) 1602–1610. doi:10.1210/endo.134.4.8137721.

[40] J.A. Johnson, J.P. Grande, P.C. Roche, R. Kumar, Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas., The American Journal of Physiology. 267 (1994) E356-60. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943215 (accessed November 17, 2017).

[41] A. Lahbib, S. Ghodbane, K. Louchami, A. Sener, M. Sakly, H. Abdelmelek, Effects of vitamin

D on insulin secretion and glucose transporter GLUT2 under static magnetic field in rat, Environmental Science and Pollution Research. 22 (2015) 18011–18016. doi:10.1007/s11356-015-4844-5.

[42] A. Norman, J. Frankel, A. Heldt, G. Grodsky, Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin, Science. 209 (1980) 823–825. doi:10.1126/science.6250216.

[43] S. Jayanarayanan, T.R. Anju, S. Smijin, C.S. Paulose, ScienceDirect Vitamin D 3 supplementation increases insulin level by regulating altered IP3 and AMPA receptor expression in the pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rat, The Journal of Nutritional Biochemistry. 26 (2015) 1041–1049. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.04.011.

[44] I.N. Sergeev, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and type 2 diabetes: Ca2+-dependent molecular mechanisms and the role of vitamin D status, Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. 26 (2016) 61–65. doi:10.1515/hmbci-2015-0069.

[45] B. Maestro, J. Campion, N. Davila, C. Calle, Stimulation by 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 of Insulin Receptor Expression and Insulin Responsiveness for Glucose Trandport in U-937 Human Promonocytic Cells, Endocrine Journal. 47 (2000) 383–391. https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj1993/47/4/47_4_383/_pdf (accessed November 17, 2017).

[46] S. Xavier, J. Sadanandan, N. George, C.S. Paulose, β2-Adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats: Antagonism by vitamin D3 and curcumin, European Journal of Pharmacology. 687 (2012) 14–20. doi:10.1016/J.EJPHAR.2012.02.050.

[47] Y. Wang, H.F. DeLuca, Is the vitamin D receptor found in muscle?, Endocrinology. 152 (2011) 354–363. doi:10.1210/en.2010-1109.

[48] Y. Wang, J. Zhu, H.F. DeLuca, Where is the vitamin D receptor?, Arch Biochem Biophys. 523 (2012) 123–133. doi:10.1016/j.abb.2012.04.001.

[49] G. Davì, A. Falco, C. Patrono, Lipid Peroxidation in Diabetes Mellitus, Antioxidants & Redox Signaling. 7 (2005) 256–268. doi:10.1089/ars.2005.7.256.

[50] H. Wiseman, Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action., FEBS Letters. 326 (1993) 285–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325381 (accessed April 18, 2018).

[51] M. Gauster, G. Desoye, M. Tötsch, U. Hiden, The Placenta and Gestational Diabetes Mellitus, Current Diabetes Reports. 12 (2012) 16–23. doi:10.1007/s11892-011-0244-5.

[52] M. del C. Figueroa-García, M.T. Espinosa-García, F. Martinez-Montes, M. Palomar-Morales, R. Mejía-Zepeda, Even a Chronic Mild Hyperglycemia Affects Membrane Fluidity and Lipoperoxidation in Placental Mitochondria in Wistar Rats., PloS One. 10 (2015) e0143778. doi:10.1371/journal.pone.0143778.

[53] E. Capobianco, D. Fornes, I. Linenberg, T.L. Powell, T. Jansson, A. Jawerbaum, A novel rat model of gestational diabetes induced by intrauterine programming is associated with alterations in placental signaling and fetal overgrowth, Molecular and Cellular Endocrinology. 422 (2016) 221–232. doi:10.1016/j.mce.2015.12.020.

[54] M. Shahbazi, M. Jeddi-Tehrani, M. Zareie, A. Salek-Moghaddam, M.M. Akhondi, M. Bahmanpoor, M.R. Sadeghi, A.H. Zarnani, Expression profiling of vitamin D receptor in placenta, decidua and ovary of pregnant mice, Placenta. 32 (2011) 657–664.

doi:10.1016/j.placenta.2011.06.013.

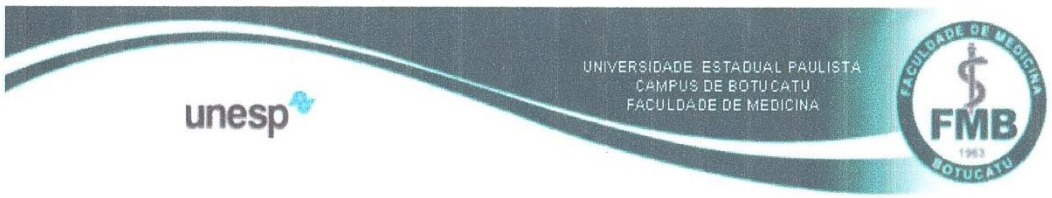
[55] J. Knabl, R. Hüttenbrenner, S. Hutter, M. Günthner-Biller, C. Riedel, U. Hiden, F. Kainer, G. Desoye, U. Jeschke, Gestational Diabetes Mellitus Upregulates Vitamin D Receptor in Extravillous Trophoblasts and Fetoplacental Endothelial Cells, Reproductive Sciences. 22 (2015) 358–366. doi:10.1177/1933719114542020.

[56] J. Knabl, A. Vattai, Y. Ye, J. Jueckstock, S. Hutter, F. Kainer, S. Mahner, U. Jeschke, Role of placental VDR expression and function in common late pregnancy disorders, International Journal of Molecular Sciences. 18 (2017) 2340. doi:10.3390/ijms18112340.

[57] A. Stephanou, R. Ross, S. Handwerger, Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3., Endocrinology. 135 (1994) 2651–2656. doi:10.1210/endo.135.6.7988455.

[58] T.C. Brelje, D.W. Scharp, P.E. Lacy, L. Ogren, F. Talamantes, M. Robertson, H.G. Friesen, R.L. Sorenson, Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy., Endocrinology. 132 (1993) 879–887. doi:10.1210/endo.132.2.8425500.

[59] M.C. Lacroix, P. Bolifraud, D. Durieux, A. Pauloin, M. Vidaud, G. Kann, Placental growth hormone and lactogen production by perifused ovine placental explants: regulation by growth hormone-releasing hormone and glucose., Biology of Reproduction. 66 (2002) 555–61. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870057 (accessed April 18, 2018).



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1158/2015-CEUA

Projeto de Pesquisa **(Protocolo CEUA 1158-2015) Tratamento alternativo do diabete em ratas prenhes: Uso de cálcio, vitaminas B12 e D**, a ser conduzido por Aline Bueno, orientada pela Profª. Drª. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos, com a colaboração de Talísia Collachiti Moreto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	24/06/2016
Espécie/Linhagem	Rato/Sprague Dawley
Nº de animais	50
Peso/Idade	250 gramas/75 dias
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Biotério CEMIB - UNICAMP

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 26/11/2015

Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros
Presidente da CEUA

Kleber Messias Camargo
Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp

FMB

Ética CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1205/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada **"Vitamina D e cálcio para o tratamento de ratas prenhes com diabete moderado"**, registrada com o n. 1205/2017, sob a responsabilidade da Eduardo Kloppel, orientado pela Profª Drª Debora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos, com a colaboração de Carolina Abreu Miranda, Danilo Chaguri, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Gustavo Tadeu Volpato,Rafaianne Queiroz de Moraes Souza, Thaigra de Sousa Soares, Tiago Rodrigues e Yuri Karen Sinzato – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 23/02/17.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/02/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Sprague Dawley
Nº de animais	74
Peso/Idade	250 gramas/100 dias
Sexo	Macho/Fêmea
Origem	Biotério do CEMIB - UNICAMP

Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da CEUA

Kleber M. Camargo
Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br