



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SANGUE E NA PLACENTA DE RATAS COM DIABETE DE INTENSIDADE MODERADA

Ana Paula Machado Spada

BOTUCATU

- 2009 -

Ana Paula Machado Spada

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO NO SANGUE E NA
PLACENTA DE RATAS COM DIABETE
DE INTENSIDADE MODERADA**

*Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Botucatu– Unesp,
Programa de Pós-Graduação em
Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia,
Área de Concentração: Obstetrícia,
para obtenção do título de Mestre.*

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Rodrigues

BOTUCATU

- 2009 -

Dedicatória

Ao meu querido Deus,

Por ser presença constante em minha vida e não me deixar tropeçar nesta caminhada em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais, Suzana e Ruberval,

Pelo incentivo e esforço durante todos esses anos, paciência, amor, respeito e pelo incansável ato educativo permanente, mostrando-me que para a educação não há tempo, nem espaço, e que se faz no fluir da vida.

À Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno,

Obrigada por me guiar em todas as fases deste curso e contribuir para meu amadurecimento científico, humano e profissional. Neste período de convivência, suas qualidades de pesquisadora e de ser humano fizeram aumentar, ainda mais, minha admiração e estima. Serei eternamente grata pela paciência, carinho, apoio e pela inestimável orientação dedicada em todas as etapas deste trabalho.

Ao Marcos Macedo,

Por sua constante presença, compreensão e pelo seu amor incondicional.

Agradecimientos

A realização deste trabalho somente foi possível em função da colaboração de muitas pessoas, que foram mostrando sua importância ao longo desta caminhada. Manifesto minha sincera gratidão a todas elas e de uma forma particular:

À Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu, em especial ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela acolhida e concessão das dependências e aparelhos durante a realização deste trabalho.

Às funcionárias Aparecida Benedita Vasques, Sandra Aparecida de Carvalho Cruz, Ana Claudia Garcia Mira e Regina Célia Gamito do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela dedicação e auxílio prestado.

Aos funcionários Janete Aparecida Nunes Silva, Regina C. Spadin, Lilian Cristina N. B. Nunes e Nathanael P. Salles da Seção de Pós-Graduação pela atenção e dedicação durante todo o período de pós-graduação.

Ao serviço da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação no campus da Unesp - Botucatu, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Ao Prof. Dr. Tiago Rodrigues, professor da Universidade de Mogi das Cruzes, pela sua dedicação, pelo grande auxílio na dosagem de estresse oxidativo em tecido placentário e pela co-orientação.

À Priscila Afonso, aluna de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes, pela sua dedicação e pelo grande auxílio na dosagem de estresse oxidativo em tecido placentário.

Aos alunos e técnicos do laboratório CIIB da Universidade de Mogi das Cruzes, pelos momentos agradáveis que me proporcionaram durante todo o período que estive no laboratório.

À Profa. Dra. Sandra Barbalho, por ter me ensinado à importância da simplicidade e humildade nos caminhos que tenho a seguir.

Ao Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos, pelo apoio dado nos momentos difíceis, pelos ensinamentos, sendo sua ajuda extremamente importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas companheiras de laboratório Yuri Karen Sinzato, Paula Helena Ortiz Lima, Ana Carolina Inasz Kiss, Isabela L. Iessi e Aline Bueno pela trocas de experiência, companheirismo e auxílio durante o período experimental, principalmente após as análises, e também pela consideração e amizade sincera no decorrer destes anos.

Às alunas Bruna Dallaqua, Gabriela Marini e Jusciele Brogin Moreli, pelas horas agradáveis, por sempre estarem prontas a me ajudar e torcerem por meu sucesso.

À técnica de laboratório Fernanda Pereira Lima, pelo auxílio na manutenção dos animais do laboratório e pela sua colaboração durante o experimento.

Aos funcionários do laboratório do Departamento de Clínica Médica, José Georgette, Camila Renata Corrêa Camacho e Corina Julieta Corrêa, que permitiram a utilização do espectrofotômetro.

Aos funcionários do Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp pela análise estatística.

À Fapesp, pela concessão de bolsa de estudo para a realização desta pesquisa

Aos amigos e familiares pela torcida e pelo apoio nas horas de desânimo.

Índice

Capítulo I

<i>Resumo</i>	
<i>Abstract</i>	
<i>Introdução</i>	
<i>Materiais e Métodos</i>	
<i>Resultados</i>	
<i>Discussão</i>	
<i>Referências Bibliográficas</i>	

Capítulo II

<i>Resumo</i>	06
<i>Abstract</i>	07
<i>Introdução</i>	08
<i>Materiais e Métodos</i>	10
<i>Resultados</i>	19
<i>Discussão</i>	20
<i>Conclusão</i>	23
<i>Referências Bibliográficas</i>	24

Anexos	35
---------------------	----

Capítulo 1

REVISÃO

Avaliação de metodologias para análise de estresse oxidativo em tecidos de ratos diabéticos

Evaluation of methodology for analysis of oxidative stress in diabetic rat tissue

Ana Paula Spada*, Tiago Rodrigues, D.Sc**, Débora Cristina Damasceno, D.Sc.***

Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, **Universidade de Mogi das Cruzes, Centro de Ciências Biomédicas, Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica, *Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp*

Resumo

Frente aos diferentes dados de literatura e dificuldade para estabelecimento de metodologia específica para determinação de estresse oxidativo em tecido, particularmente no tecido placentário, o objetivo deste artigo foi realizar uma atualização bibliográfica e organizar uma tabela com dados pertinentes às principais metodologias adotadas. Foi realizada uma revisão sistemática de literatura referente ao período de 1997 a 2007 (10 anos) no site do *database* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI – PUBMED). Segundo a estratégia realizada para a busca de artigos, foram analisados aproximadamente 1.050 artigos. Todos os artigos analisados passaram por critérios de inclusão e exclusão. Os termos-chave utilizados como critérios de inclusão estabelecidos foram: *oxidative stress* and *diabetes* and *rats*. Desta forma, foram incluídos neste artigo de revisão, trabalhos que investigassem a determinação de pelo menos uma atividade antioxidante e o marcador da peroxidação lipídica e foram excluídos trabalhos que abordassem apenas a determinação de uma atividade antioxidante ou que não realizassem a investigação bioquímica em tecidos. Dentre os artigos revisados, os tecidos mais citados para a realização das análises de estresse oxidativo foram: fígado, coração, pulmão, pâncreas e cérebro, sendo as atividades enzimáticas antioxidantes analisadas: GSH-Px, SOD e CAT e a concentração de GSH no pâncreas e cérebro. São de extrema importância o detalhamento das técnicas empregadas, com o objetivo de contribuir com informações detalhadas aos pesquisadores que buscam aprimorar suas metodologias e para promover padronização da rotina laboratorial.

Palavras-chave: estresse oxidativo, tecidos, ratos, diabetes.

Abstract

In according to different literature data and difficulty for establishment of specific methodology for determination of oxidative stress in tissue, particularly in placenta, the objective of this review was a literature updating and a table with pertinent data to main adopted methodologies. A systematic review was accomplished regarding the period from 1997 to 2007 (10 years) in the site of the database of National Center of Biotechnology Information (NCBI - PUBMED). According to

Recebido 26 de dezembro de 2007; aceito 15 de março de 2008.

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Distrito de Rubião Júnior s/n 18618-000 Botucatu SP, E-mail: damasceno@fmb.unesp.br

the strategy for the search 1050 articles were analyzed. All articles were submitted to inclusion and exclusion criteria. For inclusion criteria were used the key words: oxidative stress and diabetes and rats. Works that investigated the determination antioxidant activity and the marker of the lipid peroxidation were included. Works without biochemical investigation in tissue were excluded. Among the reviewed articles, tissues more mentioned for the accomplishment of the analyses of oxidative stress were: liver, heart, lung, pancreas and brain. The antioxidant enzymatic activities more investigated were: GSH-Px, SOD and CAT and the concentration of GSH in the pancreas and brain. It is of extreme importance to detail the techniques employed to help the researches and to improve the methods used in the laboratorial routine.

Key-words: oxidative stress, tissue, rats, diabetes.

Introdução

Estresse oxidativo é encontrado em todos os sistemas biológicos e refere-se ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os antioxidantes. Em situações fisiológicas normais, as células e organismos necessitam de defesa contra os agentes oxidantes, sem comprometer a sobrevivência sob condições aeróbias. Os oxidantes são gerados a partir do metabolismo do oxigênio (O_2) e frente à exposição a xenobióticos. O aumento da produção de ERO exerce um efeito citotóxico na membrana fosfolipídica, resultando na formação de produtos tóxicos como a peroxidação lipídica que é a mais extensiva investigação do processo de indução de radicais livres e estimula a glicação de proteínas e inativação de enzimas [1]. Pelo fato de existirem vários agentes oxidantes, também chamados de pró-oxidantes, o organismo desenvolve diferentes tipos de antioxidantes. A primeira linha de defesa contra o dano oxidativo são os antioxidantes endógenos enzimáticos: superóxido dismutase (SOD), catalase e sistema das glutations [glutathione peroxidase (GSH-Px, glutathione total (GSHt) e glutathione reduzida (GSH)]. Há também os antioxidantes não-enzimáticos que são lipossolúveis (tocoferóis, carotenos, quinonas e bilirrubinas) ou hidrossolúveis (ácido ascórbico, ácido úrico e proteínas ligadas a metais) [2].

Dentre o envolvimento de processos oxidativos mediados por ERO, pode-se citar o diabetes mellitus, ocasionado pela hiperglicemia, que leva à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneo [3]. O aumento do estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia pode ser avaliado pelo aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que indica a peroxidação lipídica. Além da concentração de TBARS, outra forma de avaliação da presença do aumento de estresse oxidativo é a redução da capacidade de defesa antioxidante, como a diminuição das atividades enzimáticas de GSH-Px e SOD [4,5].

Os marcadores enzimáticos são observados em tecidos altamente reativos a ERO [ânion superóxido

(O_2^-), radical hidroxil (OH^-) e radicais gerados durante reações metabólicas] [6,7].

A literatura aponta que os tecidos mais estudados para análise de estresse oxidativo em ensaios experimentais são: fígado, pâncreas e rins [8-10,12-15]. No entanto, as metodologias empregadas para determinação de estresse oxidativo tecidual é controversa, pois apresenta diversidade nas informações quanto ao procedimento para coleta do material, forma de armazenamento do tecido (a fresco, ou homogeneizado), tempo e temperatura de armazenamento e as metodologias empregadas para dosagem destas amostras (kits adquiridos comercialmente ou reagentes e/ou soluções preparados nos laboratórios para preparo das amostras para leitura) e equipamentos para obtenção das concentrações de TBARS e substâncias antioxidantes.

Objetivo

Frente aos diferentes dados de literatura e dificuldade para estabelecimento de metodologia específica para determinação de estresse oxidativo em tecido, particularmente no tecido placentário, o objetivo deste artigo foi realizar uma atualização bibliográfica e organizar uma tabela com dados pertinentes às principais metodologias adotadas.

Metodologia

Foi realizada uma revisão sistemática de literatura referente ao período de 1997 a 2007 (10 anos) no site do *database* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI – PUBMED). Segundo a estratégia realizada para a busca de artigos, foram analisados aproximadamente 1.050 artigos. Todos os artigos analisados passaram por critérios de inclusão e exclusão. Os termos-chave utilizados como critérios de inclusão estabelecidos foram: *oxidative stress* and *diabetes* and *rats*. Desta forma, foram incluídos neste artigo de revisão, trabalhos que investigassem a determinação de pelo menos uma atividade antioxidante e o marcador da peroxidação lipídica e foram excluídos trabalhos que abordassem apenas a determinação de

uma atividade antioxidante ou que não realizassem a investigação bioquímica em tecidos.

Resultados

Dentre os artigos revisados, os tecidos mais citados para a realização das análises de estresse oxidativo foram: fígado, coração, pulmão, pâncreas e cérebro, sendo as atividades enzimáticas antioxidantes analisadas: GSH-Px, SOD e CAT e a concentração de GSH no pâncreas e cérebro. Os artigos analisados de acordo com as amostras utilizadas, forma e tempo de congelamento, mensurações das atividades enzimáticas e marcadores de estresse oxidativo estão apresentados na Tabela I.

A Tabela I mostra que dentre as diferentes maneiras para determinar o estresse oxidativo em tecido, a mais utilizada é a homogeneização imediatamente após a coleta do material. Outra maneira também de realizar a determinação é congelar o tecido antes de homogeneizá-lo. Porém, o tempo e a temperatura ideal para o congelamento dos tecidos antes da análise não são bem descritos nos trabalhos revisados. Alguns autores descrevem que a forma de congelamento é em freezer a -80°C , não citando o tempo de armazenamento do tecido e/ou homogenato. Outros autores utilizam temperaturas de -20° e 4°C e não informam também o tempo armazenamento das amostras submetidas a essas temperaturas. Poucos trabalhos descrevem a utilização do tecido imediatamente após a coleta. A forma para determinar o quadro de estresse oxidativo frequentemente utilizada na prática laboratorial são kits comerciais e/ou reagentes preparados no próprio laboratório. Dentre os kits, os mais citados são: Randox Laboratories [26] e Oxis International [10]. A escolha pela utilização de preparo de reagentes/soluções no próprio laboratório se deve ao fato da redução de custos comparado aos valores dos kits comerciais.

Os artigos que realizam experimento, utilizando preparo dos reagentes, baseiam-se em diferentes tipos de metodologias. Dentre essas, a mais citada para determinação de TBARS é o procedimento de Ohkawa *et al.* e Draper e Hadley. Para determinação de CAT, o autor mais foi citado é Aebi *et al.* Dos trabalhos que determinam GSH, as metodologias mais citadas foram Ellman e Beutler, para GSH-Px, o procedimento mais utilizado é o de Paglia e Valentine, para Glutathione redutase a metodologia mais citada é a de Calberg e Habig para Glutathione Transferase. Para mensurar a atividade de SOD, a metodologia mais citada é de Misra e Fridovich e Marklund & Marklund.

O tipo de equipamento utilizado para avaliar a concentração desses marcadores também é relevante porque podem influenciar nos resultados das amostras

por sua sensibilidade na captação das leituras. Nesta pesquisa, o aparelho mais utilizado para mensurações foi o espectrofotômetro por possuir baixo custo quando comparados com aparelhos mais específicos para determinação de ERO. Além do espectrofotômetro, espectrofluorímetro também é citado [10,21].

Conclusão

Portanto, as informações sobre as metodologias descritas para a determinação de estresse oxidativo em tecido são de extrema importância por fornecer subsídio ao pesquisador. Para tanto, neste trabalho de revisão, constatou-se a necessidade do esclarecimento sobre metodologias empregadas nas determinações bioquímicas.

Os resultados encontrados neste artigo de revisão revelam que há vários trabalhos com excelentes resultados, mas que, muitas vezes, apresentam falhas nas informações metodológicas, dificultando a reprodutibilidade das técnicas empregadas nos laboratórios.

Nesse sentido, vários questionamentos tornam-se relevantes ao extremo, dentre eles, fatores como o tempo e a temperatura ideal para o armazenamento dos tecidos, sem que haja perda das atividades enzimáticas. Essas medidas de precaução a serem realizadas na coleta dos materiais e durante a determinação das amostras são fundamentais para garantir uma análise correta e resultados fidedignos. Tempo de armazenamento e temperatura incorretos podem comprometer os resultados da pesquisa, como exemplo, tecidos utilizados para determinação de TBARS, que armazenados em temperaturas inadequadas, podem ser comprometidos pelo fato da sua alta velocidade de reação nas amostras a serem analisadas. Com isso, é de extrema importância o detalhamento das técnicas empregadas, com o objetivo de contribuir com informações detalhadas aos pesquisadores que buscam aprimorar suas metodologias e para promover padronização da rotina laboratorial.

Referências

1. Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43:550-7.
2. Damasceno DC, Volpato GT, Calderon IMP, Cunha Rudge, MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci* 2002;15;72(3-4):235-4.
3. Yazdanparast R, Ardestani A, Jamshidi S. Experimental diabetes treated with *Achillea santolina*: Effect on pancreatic oxidative parameters. *J Ethnopharmacol* 2007;30;112(1): 13-8.
4. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004;122(4):369-82.

Tabela I - Metodologias empregadas nas amostras utilizadas, temperatura e tempo de congelamento, tipo de material utilizado para determinações das atividades enzimáticas e marcadores de estresse oxidativo.

Forma de amostra		Forma de congelamento				Tempo de congelamento	Determinação		Equipamento utilizado			Referências	
Ho-mo-gena-to	Teci-do	SI*	-80°C	-2°C	4°C		SI*	Kits	Reagen-tes	Espec-trofotô-metro	Outros Equipa-mentos		SI*
		x				x	SI	x	x	x		8	
x			Tecido utilizado imediatamente após coleta						x	x		16	
x						x	SI		x	x		9	
x			Tecido utilizado imediatamente após coleta					x		x	x	10	
	x		x				SI		x	x		17	
		x				x	SI		x	x		18	
x						x	SI	x	x	x		19	
		x				x	SI		x	x		20	
		x				x	SI		x		x	21	
x				x			20 minutos		x	x		22	
		x				x	SI		x	x		23	
	x		x				SI		x	x		11	
	x			x			SI		x	x		24	
x						x	SI	x				12	
x						x			x	x		13	
						x	SI	x				25	
x						x	SI				x	26	
						x	SI		x		x	27	
x						x	SI		x	x	x	28	
x			Tecido utilizado imediatamente após coleta						x			x	29
						x	SI				x	30	
x							SI		x	x	x	14	
x			x				SI		x		x	15	
x						x	SI		x	x	x	31	
x		x				x	SI		x	x	x	32	
		x		x			SI	x	x			x	33
x						x	SI		x	x	x	34	
x						x	SI		x	x		35	
x							Nitro-gênio. Esto-cado a -80°C antes de usar	x		x		36	
		x				x	SI	x			x	37	
x						x	SI		x		x	38	
		x				x	SI		x	x		39	
x						x	SI		x	x		40	
		x				x	SI		x		x	41	
x					x		SI		x	x		42	
x			Tecido utilizado imediatamente após coleta						x	x		43	

* SI= Sem informação

5. Tamura T, Olin KL, Goldenberg RL, Johnson KE, Dubarb MB, Keen C. Plasma extracellular superoxide dismutase activity in healthy pregnant women is not influenced by zinc supplementation. *Biol. Trace Elem Res* 2001;80:107-14.
6. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;7(N3):235-46.
7. Simibe MM, Banni S, Angioni E, Corta G, De Migeio WMR, Muroli MR, et al. 5-Methyl thioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatol* 2001;34(3):386-94.
8. Coskun O, Ocakci A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med* 2004;203(3):145-54.
9. Yazdanparast R, Ardestani A, Jamshidi S. Experimental diabetes treated with *Achillea santolina*: effect on pancreatic oxidative parameters. *J Ethnopharmacol* 2007; 30;112(1):13-8.
10. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W, Kinalska I. Antioxidant therapy and streptozotocin-induced diabetes in pregnant rats. *Acta Diabetol* 1999;36(3):113-7.
11. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem* 2003;14(5):288-94.
12. Ou SY, Jackson GM, Jiao X, Chen J, Wu JZ, Huang XS. Protection against oxidative stress in diabetic rats by wheat bran feruloyl oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 2007; 18;55(8):3191-5.
13. Li XM. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol* 2007; 10;40(5):461-5.
14. Seven A, Guzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayirli M, Uncu M, et al. Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J* 2004; 31;45(4):703-10.
15. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 2003;142(3):172-7.
16. Manea A, Constantinescu E, Popov D, Raicu M. Changes in oxidative balance in rat pericytes exposed to diabetic conditions. *J Cell Mol Med* 2004;8(1):117-26.
17. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2000;42(4):361-71.
18. Ozansoy G, Akin B, Aktan F, Karasu C. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2001;216(1-2):59-63.
19. Gumieniczek A, Hopkała H, Wójtowicz Z, Nieradko M. Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 2001; 314(1-2):39-45.
20. Zobali F, Avci A, Canbolat O, Karasu C. Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. *Cell Biochem Funct* 2002;20(2):75-80.
21. Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr* 2002 May;132(5):897-900.
22. Kedziora-Kornatowska K, Szram S, Kornatowski T, Szadujkis-Szadurski L, Kedziora J, Bartosz G. The effect of verapamil on the antioxidant defence system in diabetic kidney. *Clin Chim Acta* 2002;322(1-2):105-12.
23. Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, et al. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* 2003;28(6):815-23.
24. Aybek H, Aybek Z, Rota S, Sen N, Akbulut M. The effects of diabetes mellitus, age, and vitamin E on testicular oxidative stress. *Fertil Steril*. 2007 May 4 In Press doi:10.1016/j.fertnstert.2007.01.101.
25. Kowluru RA, Atasi L, Ho YS. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(4):1594-9.
26. Yanardag R, Tunali S. Vanadyl sulfate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats. *Mol Cell Biochem* 2006;286(1-2):153-9.
27. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res* 2002;32(4):225-30.
28. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;13(1):23-30.
29. Yadav P, Sarkar S, Bhatnagar D. Action of caparris decidua against alloxan-induced oxidative stress and diabetes in rat tissues. *Pharmacol Res* 1997;36(3):221-8.
30. Alper G, Olukman M, Irer S, Cağlayan O, Duman E, Yilmaz C, et al. Effect of vitamin E and C supplementation combined with oral antidiabetic therapy on the endothelial dysfunction in the neonatally streptozotocin injected diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22(3):190-7.
31. Sarkhail P, Rahmanipour S, Fadyevatan S, Mohammadirad A, Dehghan G, Amin G, et al. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol Res* 2007;56(3):261-6.
32. Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl* 2007;30(6):508-18.
33. Tas S, Sarandol E, Ayvalik SZ, Serdar Z, Dirican M. Vanadyl sulfate, taurine, and combined vanadyl sulfate and taurine treatments in diabetic rats: effects on the oxidative and antioxidative systems. *Arch Med Res* 2007;38(3):276-83.

34. Ramana BV, Kumar VV, Krishna PN, Kumar CS, Reddy PU, Raju TN. Effect of quercetin on galactose-induced hyperglycaemic oxidative stress in hepatic and neuronal tissues of Wistar rats. *Acta Diabetol* 2006;43(4):135-41.
35. Tunali S, Yanardag R. Effect of vanadyl sulfate on the status of lipid parameters and on stomach and spleen tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2006;53(3):271-7.
36. Yue KK, Lee KW, Chan KK, Leung KS, Leung AW, Cheng CH. Danshen prevents the occurrence of oxidative stress in the eye and aorta of diabetic rats without affecting the hyperglycemic state. *J Ethnopharmacol* 2006; 15;106(1):136-41.
37. Wu YG, Lin H, Qi XM, Wu GZ, Qian H, Zhao M, et al. Prevention of early renal injury by mycophenolate mofetil and its mechanism in experimental diabetes. *Int Immunopharmacol* 2006; 6(3): 445-53.
38. Singh N, Kamath V, Rajini PS. Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. *Clin Chim Acta* 2005; 353(1-2):165-75.
39. Latha M, Pari L, Sitasawad S, Bhonde R. *Scoparia dulcis*, a traditional antidiabetic plant, protects against streptozotocin induced oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo. *J Biochem Mol Toxicol* 2004;18(5):261-72.
40. Pari L, Latha M. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipid peroxidation in STZ diabetic male Wistar rats. *BMC Complement Altern Med* 2004;2;4:16.
41. Ushiyama M, Morita T, Kuramochi T, Yagi S, Katayama S. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. *Hypertens Res* 2004;27(4):253-61.
42. Gupta S, Kataria M, Gupta PK, Murganandan S, Yashroy RC. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. *J Ethnopharmacol* 2004;90(2-3):185-9.
43. Ugochukwu NH, Cobourne MK. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. *Clin Chim Acta* 2003;336(1-2):73-81.
44. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43(1):61-8.

Capítulo 2

**Avaliação do estresse oxidativo no sangue e na placenta de ratas com
diabete de intensidade moderada**

Ana Paula Machado Spada¹, Tiago Rodrigues², Priscila Afonso Ferreira², Yuri
Karen Sinzato¹, Marilza Vieira Cunha Rudge¹, Débora Cristina Damasceno^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia,
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp); ²Universidade de Mogi das
Cruzes - Centro de Ciências Biomédicas, Centro Interdisciplinar de
Investigação Bioquímica, Estado de São Paulo, Brasil

**Correspondência para:* Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp
Distrito de Rubião Júnior s/n
18618-000 – BOTUCATU – SÃO PAULO - BRASIL
Fone/Fax: (+55 14) 3811 6181
damasceno@fmb.unesp.br

Este capítulo da dissertação foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista
Life Sciences, para o qual será submetido.

Resumo

Objetivo: avaliar o estresse oxidativo no sangue e na placenta de ratas com diabetes de intensidade moderada. Métodos: O diabetes foi induzido em ratas Wistar recém-nascidas (grupo diabetes moderado) no dia do nascimento (dia 0) por streptozotocin (100 mg/kg, via subcutânea). As ratas do grupo não-diabético (controle) receberam somente tampão citrato. Na vida adulta, as ratas (diabéticas e controle) foram submetidas ao acasalamento e o dia de diagnóstico positivo de prenhez foi considerado dia 0. A glicemia foi determinada nos dias 0, 7, 14 e 21 de prenhez. No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas e dessangradas para determinação das atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GSH-Rd) e das concentrações de grupos tiólicos (SH) e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Em seguida, as placentas foram retiradas e processadas para determinação das atividades de SOD e catalase e concentração de TBARS, glutathione reduzida e grupos tiólicos. Resultados: Ratas com diabetes induzido no período neonatal (grupo diabético) apresentaram glicemia superior a 120mg/dl no dia 0 de prenhez e foi observada hiperglicemia no 14º dia de prenhez. A análise do estresse oxidativo em hemáceas lavadas mostrou que no grupo diabético houve aumento significativo na atividade da GSH-Px. No tecido placentário a atividade da catalase foi significativamente maior em ratas com diabetes moderado. Conclusão: Frente às condições experimentais analisadas, o aumento dos biomarcadores do sistema antioxidante em ratas com diabetes de intensidade moderada foram suficientes para conter o estresse oxidativo.

Palavras – chave: Streptozotocin, ratas, diabetes, estresse oxidativo, placenta

Abstract

Objective: To evaluate the oxidative stress in blood sample and placental of female rats that received *streptozotocin* in the neonatal period. **Methods:** The diabetes was induced in female offspring (diabetic group) in the day of the birth (day 0) for *streptozotocin* (100 mg/kg, subcutaneous route). Female control rat (control group) received only citrate buffer. In the adult life, the female rats were submitted to the mating and the day the positive diagnosis, was considered day 0 of pregnancy. The glycemia was measured in the 0, 7, 14 and 21 of pregnancy. At day 21 of pregnancy, the female rats were anesthetized and died by decapitation for collection of the blood for determination of the enzymatic activity of the superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GSH-Rd) and of the concentrations of thiols group and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Afterwards, placental were removed and processed for determinations of the enzymatic activity of the SOD and catalase and of the concentrations of the TBARS, glutathione reduced (GSH) and thiols group (SH). **Results:** Diabetic rats presented blood glucose concentration greater than 120 mg/dL in the day 0 of pregnancy and hyperglycemia in 14^o day of pregnancy. The analysis of the oxidative stress in maternal blood sample showed increased in GSH-Px activity. In placental tissue catalase activity of diabetic group is found to be increase in homogenate tissue in diabetic group. **Conclusion:** The hyperglycemia in diabetic rats increased antioxidant system biomarkers, however, these alterations were enough to control oxidative stress.

Keywords: *Streptozotocin*, rat, diabete, oxidative stress, placental

Introdução

Diabetes mellitus (DM) é considerada como uma das principais doenças crônicas caracterizada por hiperglicemia resultante de resistência à insulina e/ou deficiência insulínica secundária à falha nas células beta (β)-pancreáticas (De Fronzo 1997; American Diabetes Association - ADA 2008).

O diabetes induzido por agente β -citotóxico tem sido muito usado para estudar a fisiopatologia do diabetes. Streptozotocin (STZ) é uma droga β -citotóxica e foi primeiramente extratido como um antibiótico do *Streptomyces achromogenes* em 1960 (Herr et al. 1959). É um análogo da nitrosuréia no qual N-metil-N-nitrosuréia está ligado ao carbono-2 de uma hexose. STZ é acumulada seletivamente nas células beta (β)-pancreáticas via transportador de glicose (GLUT2) na membrana plasmática (Karunanayake et al. 1976). As células produtoras de insulina que não expressam GLUT são resistentes ao streptozotocin. Isto explica a maior toxicidade do streptozotocin comparado a N-metil-N-nitrosuréia nas células que expressam GLUT2, embora ambas as substâncias alqueiem o DNA com extensão similar (Elsner et al. 2000; Ledoux et al. 1986).

Diversos estudos têm enfatizado o papel das espécies reativas ao oxigênio (ERO) como mecanismo central para a toxicidade da glicose nas células β -pancreáticas. As células β são extremamente sensíveis a ERO devido ao alto requerimento energético e baixa expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) (Tiedge et al. 1997; Ceriello and Motz 2004; Simmons 2006). A geração excessiva de ERO altera a secreção de insulina e diminui a expressão genética

das células β , o que induz a morte celular (Sakai et al. 2003; Kaneto et al. 2002).

Pancreatectomia e uso de agentes β -citotóxicos (aloxana e streptozotocin) são exaustivamente usados para desenvolver um modelo animal que mimetize o quadro clínico de Diabetes mellitus gestacional (DM gestacional) e, parcialmente, o DM2, há diferentes metodologias empregadas para obtenção do diabetes de intensidade moderada nos animais (glicemia entre 120 e 300 mg/dL) (Soulimane-Mokhtari et al. 2005). Dentre eles, ressalta-se a administração de diferentes doses de streptozotocin durante a prenhez (Mulay et al. 1983; Heinze and Vetter 1987; Oh et al. 1988, 1991; Gelardi et al. 1990; Plagemman et al. 1999; Merzouk et al. 2000, 2001, 2002 a,b; Lopez-Soldado and Herrera 2003; Soulimane-Mokhtari et al. 2005) e no período neonatal (Portha et al. 1974; Bonner-Weir et al. 1981; Triadou et al. 1982; Portha and Kergoat 1985; Blondel et al. 1989, 1990; Movassat et al. 1997; Murali and Goyal 2001; Capobianco et al. 2003). No entanto, os resultados obtidos são divergentes no que se refere à glicemia, presença de macrossomia fetal, pesos das placentas e perfil lipídico.

Em situações fisiológicas, a gestação aumenta produtos da peroxidação de maneira proporcional aos mecanismos de defesa antioxidante para que no final os agentes antioxidantes superem os processos oxidativos. Se o estado diabético está associado ao aumento generalizado de ERO e redução de agentes antioxidantes, este quadro pode ser agravado durante a gestação. No ambiente hiperglicêmico, a produção aumentada de ERO está relacionada à glicação não-enzimática de proteínas plasmáticas e auto-oxidação da glicose (Tames et al. 1992; Myatt and Cui 2004).

Estudos prévios mostram a presença de estresse oxidativo em portadoras de Diabetes mellitus gestacional (DM gestacional), bem como na placenta de mulheres com DM gestacional, sendo as principais razões para isso a falha no mecanismo de defesa antioxidante e a produção aumentada de radicais livres (Kamath et al. 1998; Coughlan et al. 2001; Biri et al. 2006).

A placenta corresponde à interface da circulação materna e fetal. Tem importante papel na proteção do feto aos efeitos adversos do meio materno diabético. No entanto, na presença de alterações na função placentária, este estado pode ser exacerbado (Jauniaux et al. 2006; Cross et al. 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o estresse oxidativo no sangue e nas placentas de ratas com diabetes de intensidade moderada e comparar aos de ratas não-diabéticas (controle).

Material e Métodos

Animais e indução do diabetes experimental

Foram utilizadas ratas Wistar virgens, em idade reprodutiva (três meses), pesando entre 180 e 200g e machos da mesma espécie, adultos pesando em torno de 250g. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12/12h). Água e ração foram oferecidos ad libitum. Todos os animais foram fornecidos e mantidos pelo Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp). Os animais foram submetidos ao acasalamento para obtenção de recém-nascidos. Todos os procedimentos experimentais aplicados

nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

No dia do nascimento (dia 0), os recém-nascidos receberam streptozotocin (STZ - SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), na dose de 100 mg/kg de peso corporal (Portha et al., 1974), diluído em tampão citrato (0,1 mol/l, pH 4,5), via subcutânea (Tsuji et al., 1988). As ratas do grupo não-diabético (controle) receberam somente tampão citrato no mesmo volume das ratas que receberam a droga diabetogênica. Os recém-nascidos foram deixados com suas mães, com número máximo de oito filhotes, até o desmame (21º dia pós-natal).

Acasalamento dos animais e período de prenhez

Durante a vida adulta dos animais (110º dia de vida), foi iniciada a fase de acasalamento com duração máxima de 15 dias. A presença de espermatozóides e diagnóstico da fase estro do ciclo estral foi considerado dia 0 de prenhez (Damasceno et al. 2002).

Foram incluídas, no grupo diabético (diabete moderado), ratas que apresentassem valores glicêmicos iguais ou maiores que 120 mg/dl até 300 mg/dl e, no grupo não-diabético (controle), ratas com glicemia inferior a 120 mg/dl (Soulimane-Mokhtari et al. 2005) no dia 0 de prenhez. Durante o período de prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais e, nas manhãs dos dias 0, 7, 14 e 21 deste período, foi determinada a glicemia das ratas colhendo-se uma gota de sangue através de punção com agulha na parte distal da cauda de cada rata. A gota de sangue foi depositada em glicofita (*One*

Touch Ultra – Johnson & Johnson[®]) e esta foi lida em glicosímetro da mesma marca. Os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dl).

Obtenção das amostras de sangue e das placentas

No 21º dia de prenhez, as ratas (n=15 /grupo) foram anestesiadas letalmente com tiopental sódico (Tiopentax[®]) e foi realizado dessangramento para coleta de sangue materno. Em seguida, foi realizada a laparotomia nas fêmeas para retirada das placentas. As amostras de sangue e placenta foram processadas para determinação do estresse oxidativo. Na hemáceas lavadas foram realizadas as determinações das concentrações das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupo tiólicos e determinação das atividades enzimáticas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GSH-Rd) e glutathione peroxidase (GSH-Px). As placentas foram processadas e armazenadas para determinação das concentrações de TBARS, grupo tiólicos, glutathione reduzida (GSH) e atividade enzimática SOD e catalase.

Análise do estresse oxidativo em hemáceas lavadas

Obtenção e preparação das amostras de sangue

As amostras de sangue obtidas após dessangramento das ratas-mães foram coletadas em tubos de ensaio com anticoagulante e centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos à 4°C. Para obtenção das hemáceas, o sangue foi lavado com tampão-salina-fosfato (PBS), a 4°C e centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos por três vezes. Após este procedimento, foi realizada a retirada do plasma, glóbulos brancos e plaquetas por aspiração. Às hemáceas lavadas (50

μL) foram adicionados 950 μL de água deionizada e agitados por inversão para obtenção do hemolisado. O hemolisado foi utilizado para determinação de hemoglobina e determinações dos biomarcadores do estresse oxidativo: atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) e concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para a determinação da atividade enzimática de glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione redutase (GSH-Rd) e grupo tiólicos, a água deionizada foi substituída por solução estabilizadora (2,7 mM EDTA e 0,7 mM 2-mercaptoetanol). Todas as técnicas para determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas hemáceas lavadas seguiram a metodologia descrita por Ferreira et al. 1999.

Determinação de hemoglobina

A determinação de hemoglobina foi realizada como base para o cálculo das demais determinações. Para esse ensaio, 20μl do hemolisado foram diluídos e agitados em 2,0 ml de solução de Drabkin. Após 10 minutos de repouso, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 546nm e expressa em g/dL.

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – para avaliação da peroxidação lipídica

Foi adicionado 1,0 ml de ácido sulfossalicílico (3,0%) a 1,0 ml de hemolisado, agitado por 10 segundos, centrifugado a 11.000 rpm por 3 minutos e deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 μl de ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,67%) a 500 μl de hemolisado. A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância determinada em espectrofotômetro com

comprimento de onda de 535nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por grama de hemoglobina (nM/gHb)

Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol[®] pelo ânion superóxido. A mistura consiste na adição de 100 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 20 µL de pirogalol[®] 10mM e 860 µL de água deionizada a 20 µl de hemolisado. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25°C) por 5 minutos. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol[®], por miligrama de hemoglobina, é definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em UI/mgHb.

Determinação da concentração da proteína tiól (SH)

O conteúdo de grupo tióis foi determinado pela adição da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que iniciou a reação enzimática do grupo SH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A mistura consiste na adição de 1.290 µl de água destilada, 200 µl de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 µl de 10 UI/ml de glutatona redutase (GSH-Rd), 200 µl de NADPH (2mM) e 100 µl de DTNB (12 mM) a 10 µl de hemolisado. Para obtenção da curva padrão do grupo tióis, foi realizado o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra de hemolisado por 10 µl de solução padrão 1:1000 glutatona oxidada (GSSG) a 33 µM. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com

comprimento de onda de 412 nm. A concentração da GSH-t foi expressa em micromolar do substrato reduzido por grama de hemoglobina ($\mu\text{M/gHb}$).

Determinação da atividade enzimática de glutathione peroxidase (GSH-Px).

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH. A mistura consiste na adição de 1.300 μl de água destilada, 200 μl de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 μl de 10 UI/mL de glutathione reductase (GSH-Rd), 200 μl de NADPH (2mM), 40 μl de GSH (0,1 M) e 40 μl de hemolisado. A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida, foram adicionados 20 μl de T-Butil hidroperóxido (7mM) e mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por grama de hemoglobina (UI/gHb).

Determinação da atividade enzimática de glutathione reductase (GSH-Rd).

A determinação da atividade da GSH-Rd foi realizada pela oxidação do NADPH que catalisa a reação do GSSG a GSH. A mistura consiste na adição de 780 μL de água bidestilada deionizada, 50 μL de tampão TRIS/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 100 μL de GSSG 33mM para a redução e 20 μL de hemolisado. A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida, foram adicionadas 50 μL de NADPH (2mM) e mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm, a partir de 5 minutos da reação. A atividade da GSH-Rd foi

expressa em unidades de atividade enzimática por grama de hemoglobina (UI/gHb).

Análise do estresse oxidativo no tecido placentário

Preparo do Homogenato

As placentas foram coletadas, pesadas, lavadas com solução fisiológica tamponada (PBS 0,1M) para reduzir ao máximo a presença de sangue e, a seguir, foram mantidas em freezer a -80°C. No momento da análise, as placentas foram descongeladas, picotadas e trituradas em homogeneizador (MPV 306 - Marconi[®]) com PBS (0,1M, pH 7,4) durante 1 minuto. A mistura suspensa foi centrifugada a 9000 x g durante por 10 minutos a 4°C para obtenção do sobrenadante e determinação das concentrações de TBARS, glutatona reduzida, grupos tióis e atividades enzimáticas de SOD e catalase.

Determinação da proteína

A determinação de proteína foi realizada de acordo com a metodologia de Lowry et al. 1951.

Determinação das espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinação de TBARS, foi adicionado 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (m/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L). A mistura foi agitada em vórtex e, em seguida, foi adicionado 0,1 ml de NaOH 10 mol/l e 0,5 ml de ácido fosfórico 20% (v/v), e agitada em vórtex novamente. Sequencialmente, a mistura foi incubada durante 20 minutos a 85°C. Após atingir a temperatura

ambiente, o complexo TBA foi extraído com 2 ml de n-butanol sob agitação em vórtex, seguido de centrifugação a 25°C a 1500rpm durante três minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 532nm. A concentração de TBARS foi calculada a partir de um $\varepsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ (mol/l)}^{-1}$ (Buege and Aust 1978).

Determinação da proteína tiól (SH)

A oxidação de grupo tióis das proteínas de membrana foi induzida por T-Butil hidroperóxido a 0,6mM e CaCl_2 a 10mM. Em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) a 6% (v/v), centrifugados a 13.000g por 10 minutos para obtenção do precipitado. Este foi ressuspenso em 1ml de tampão fosfato de potássio a 0,5M, pH 7,6 e após a adição do ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) (0,1mM), a absorbância do SH precipitado foi determinada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 412nm, sendo a concentração de grupo tiólicos calculada usando $\varepsilon = 13.600 \text{ (mol/l)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Jocelyn 1987).

Determinação de glutathiona reduzida (GSH)

O homogenato foi incubado na presença de succinato 10 $\mu\text{L/mL}$ por 30 minutos à 37 °C. Para determinação do GSH, foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético a 13% (m/v), agitado em vórtex, e centrifugado em 900g por cinco minutos a 20°C. Foram adicionadas alíquotas (100 μL) do sobrenadante e 1900 μL do meio de glutathiona (contendo 2,0 mL de NaH_2PO_4 a 100 mmol/L, pH 8,0 e EGTA 5 mmol/L). Em seguida, foram submetidos à agitação em vórtex, e incubados por 15 minutos a 37°C. A fluorescência foi determinada usando os

comprimentos de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente, em um espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão) (Hissin and Hilf 1976).

Determinação da atividade de catalase

A atividade de catalase foi determinada pelo desaparecimento do peróxido de hidrogênio utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda a 240nm. Uma alíquota (50ml) do homogenato foi adicionada ao meio de incubação, composto por H₂O₂ a 2 mmol/l e fosfato de potássio a 0,05 mol/l, pH 7,0 a 25°C (volume final 2 ml). A diminuição da absorbância em 240nm foi registrada por dois minutos e a velocidade inicial foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 0,0394 cm³/mmol (Nelson and Kiesow, 1972). Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mmol/l de H₂O₂/min a 25°C em pH 7,0 (Kitani et al. 1998).

Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

Para o ensaio, uma alíquota (suficiente para reduzir o ferricitocromo c em uma razão de 0,025 Ab/min a 550nm) da solução de xantina oxidase foi adicionada em 2 ml do meio de reação composto por citocromo c 10 µmol/l, xantina 50µmol/l, EDTA a 0,1 mmol/l e fosfato de potássio a 50 mmol/l (pH 7,8). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de luz com comprimento de onda a 550nm a 25°C. A quantidade de SOD presente no homogenato adicionada à mistura acima, que causa 50% de inibição da redução do citocromo c (ou seja, 0,0125 unidade de absorbância/min), foi definida como unidade de atividade enzimática (McCord and Fridovich 1969).

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. As comparações dos valores médios das glicemias realizada durante a prenhez, foi empregado o teste t. Para análise do estresse oxidativo nas hemáceas lavadas e tecido placentário, os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados de acordo com o teste t. Para os dados apresentaram distribuição assimétrica, foi empregado a transformação inversa normal gama. Para todas as comparações estatísticas, foi considerado limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

A evolução da glicemia das ratas dos grupos diabético (diabete moderado) e grupo não-diabético (controle) durante o período de prenhez está apresentada na Figura 1. A média glicêmica das ratas do grupo não-diabético (controle) manteve-se em torno de 100mg/dl nos diferentes momentos da prenhez. As ratas com diabete induzido no período neonatal (grupo diabético) apresentaram glicemia superior a 120mg/dl no dia 0 de prenhez. No 7º e 21º dias de prenhez, o grupo diabético (diabete moderado) não apresentou alterações ($p > 0,05$) nas médias glicêmicas. Foi observada hiperglicemia ($p < 0,05$) no 14º dia de prenhez nas ratas diabéticas (Figura 1).

Com relação à determinação do estresse oxidativo nas hemáceas lavadas, não houve alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de grupos tiólicos nas ratas com diabete. O diabete induzido no período neonatal também não alterou

($p > 0,05$) as atividades enzimáticas de SOD e de GSH-Rd. As ratas diabéticas apresentaram praticamente o dobro da atividade de GSH-Px ($p < 0,05$) em relação ao grupo não diabético (Tabela 1).

A Tabela 2 ilustra os resultados obtidos sobre a determinação de estresse oxidativo no tecido placentário. O diabetes moderado não alterou de forma significativa ($p > 0,05$) as concentrações de TBARS, GSH e grupo tiólicos. Quanto às atividades enzimáticas, as ratas diabéticas não apresentaram mudança significativa ($p > 0,05$) na atividade de SOD. A atividade de catalase foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas amostras de tecido placentário das ratas diabéticas.

Discussão

Diversos trabalhos da literatura afirmam que a indução do diabetes utilizando streptozotocin (STZ) durante o período neonatal causa o aparecimento de diabetes de intensidade moderada na fase adulta desses animais (Portha et al. 1974, 1979; Portha and Serradas 1991). No entanto, esses mesmos trabalhos não apontam o percentual de ratas que apresentaram hiperglicemia na faixa de 120 a 300 mg/dl (Murali and Goyal 2001; Capobianco et al. 2003). Em nosso estudo, foi verificado que 38% das ratas acasaladas e/ou prenhes (dados não-mostrados) foram utilizadas considerando o critério de inclusão com relação à faixa glicêmica para diabetes moderado. No presente trabalho, as ratas diabéticas apresentaram hiperglicemia no dia zero de prenhez e isto permitiu a inclusão dessas ratas no grupo diabetes moderado. No entanto, as ratas do grupo diabético apresentaram normoglicemia no 7º e 21º dias de prenhez. Este

fato não corrobora com a literatura visto que ratas com hiperglicemia associada à prenhez deveriam, pelo menos, manter esses níveis glicêmicos ao longo do período gestacional. Cabe ressaltar que, no 14º dia de prenhez (período fetal), houve uma diferença significativa entre as médias glicêmicas, sendo maior no grupo diabético. Isto corrobora com dados em gestantes, pois mulheres portadoras de Diabetes mellitus gestacional apresentam hiperglicemia em torno da 24-26ª semana (Diamant 1982; Desoye and Hauguell de Mouzon 2007), período equivalente ao citado nas ratas.

Sabe-se que os hormônios sintetizados pela placenta são responsáveis pela alteração no metabolismo de carboidratos, conseqüentemente levando a um quadro mais exacerbado de resistência à insulina no tecido periférico (Triadou et al.1982). Esta afirmação contempla o resultado encontrado no 14º dia de prenhez com relação à glicemia de nosso estudo. Houve presença de intolerância à glicose, evidenciada pelo teste oral de tolerância à glicose, e resistência branda à insulina, mostrada pelo teste de resistência à insulina (dados não mostrados – submetidos à publicação), caracterizando diabete moderado.

A análise de TBARS como indicador de peroxidação lipídica é extremamente importante por estar relacionado com aumento da rigidez de membrana, fragilidade osmótica, perda da plasticidade e diminuição do tempo de vida das hemáceas (Jain et al. 1983). Para tanto, as hemáceas são escolhidas como amostras biológicas por serem particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, possuírem alto teor de ferro, ácidos graxos insaturados e, como outras células existentes em um organismo aeróbio, ricas em mecanismos antioxidantes na tentativa de conter as ações tóxicas de radicais livres (Paşaoğlu et al. 2004;

Richards et al. 1998). É importante ressaltar que, nos eritrócitos, o antioxidante de maior importância é a glutathiona. O GSH age como tampão para manter o grupo tiol (SH) na hemoglobina e mantém as enzimas em estado reduzido para proteger as proteínas contra oxidação (Carrol et al. 2006; Çimen 2008).

Com relação aos resultados encontrados no presente estudo sobre o estresse oxidativo em eritrócitos, não foram observadas alterações nas taxas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de grupos tiólicos e também nas atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD) e de glutathiona redutase (GSH-Rd). Esses resultados mostraram que, aparentemente, os animais não apresentavam estresse oxidativo exacerbado e isto estaria relacionado à normoglicemia observada no mesmo de coleta das amostras de sangue (21º dia de prenhez). No entanto, foi verificado aumento da atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GSH-Px) nas ratas do grupo diabético, sendo uma resposta benéfica, pois contribuiu para a não-elevação das taxas de TBARS, controlando a peroxidação lipídica. Outra importante contribuição para explicar tal fato é que estudo sobre avaliação dos danos oxidativos em ratas com diabetes moderado demonstrou aumento dos sítios sensíveis à enzima de reparo Fpg (formamidopirimidina glicosilase), mostrando que a taxa glicêmica encontrada nestas ratas não foi suficiente para intensificar o estresse oxidativo, o que relacionou que os sítios sensíveis à Fpg são induzidos por alterações glicêmicas e não são dependentes do estresse oxidativo (França 2008).

Em nosso estudo, não houve alterações nas amostras de tecido placentário com relação à TBARS, SOD, GSH e grupo tiólicos no tecido placentário. Da mesma forma que ocorreu nas amostras de eritrócitos, não houve aumento do

estresse oxidativo na placenta. Porém, a atividade enzimática da catalase foi aumentada. Esses resultados corroboram com outra investigação realizada durante a gestação, que mostra aumento da atividade da SOD e Catalase no tecido placentário frente à decomposição de hidroperóxidos gerados em reações mediadas por radicais livres (Takehara et al. 1990). Em pacientes diabéticos, o aumento da atividade de catalase pode ser explicado devido a baixos níveis de óxido nítrico (NO) presente no sangue, que reduz a ligação de NO com catalase, e aumenta a degradação de peróxido de oxigênio (H₂O₂), elevando a atividade desta enzima (Djordjevic et al. 2004; Brunelli et al. 2001). Por outro lado, há estudos que mostram que, na gestação complicada pelo diabetes, há redução na atividade de catalase no plasma e no tecido placentário (Biri et al. 2006). Embora existam resultados conflitantes na literatura, diversos estudos são realizados para explicar os efeitos da produção de EROS na gestação complicada pelo diabetes (Kinalski et al. 1999, 2001; Radjl et al. 2005; Coughlan et al. 2001; Orhan et al. 2003). No entanto, estudos mostram que o aumento de EROS pode não ter uma relação direta com a hiperglicemia aguda e pode desenvolver apenas naqueles indivíduos com capacidade de defesa antioxidante comprometida (Choi et al. 2008). Este fato pode ser ativado por um mecanismo de adaptação celular induzido por desbalanço glicêmico ou devido ao aumento na glicemia associado ao pobre estado antioxidante (Dröge 2002).

Conclusão

De acordo com os resultados apresentados nas condições experimentais realizadas, pode-se concluir que ratas com diabetes de intensidade moderada

apresentaram aumento nas atividades de glutathiona peroxidase em eritrócitos e de catalase na placenta demonstrando que o aumento desses biomarcadores foram suficientes para conter o estresse oxidativo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fernanda Pereira Lima pelo auxílio técnico prestado, às alunas Isabela Lovizutto Lessi e Aline Bueno pela manutenção dos animais; ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp pelo auxílio na análise estatística e à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela bolsa concedida à Ana Paula Machado Spada (Processo No. 2007/02673-1)

Referências

- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32, S30-S45, 2008.
- Biri A, Kavutcu M, Bozkurt N, Devrim E, Nurlu N, Durak I. Investigation of Free Radical Scavenging Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Human Placental Tissues with Miscarriage. *Journal of the Society For Gynecologic Investigation* 13(5),384-388, 2006.
- Blondel O, Bailbé D, Portha B. Insulin resistance in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal (5 days) *streptozotocin*: evidence for reversal following phlorizin treatment. *Metabolism* 39(8), 787-793, 1990.

- Blondel O, Bailbe D, Portha B. Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NIDDM adult rats given streptozocin as neonates. *Diabetes* 38(5), 610-617, 1989.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to *streptozotocin*. *Diabetes* 30, 64-69, 1981.
- Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Méd.* 30(7), 709-714, 2001.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52,302-310, 1978.
- Capobianco E, Jawerbaum A, White V, Pustovrh C, Sinner D, Gonzalez ET. Elevated levels of endothelin-1 and prostaglandin E2 and their effect on nitric oxide generation in placental tissue from neonatal *streptozotocin*-induced diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68(3), 225-231, 2003.
- Carroll J, Raththagala M, Subasinghe W, Baguzis S, D'amico Oblak T, Root P, Spence D. An altered oxidant defense system in red blood cells affects their ability to release nitric oxide-stimulating ATP. *Mol. Biosyst.* 2, 305-311, 2006.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 816-823, 2004.

- Choi SW, Benzie IFF, Ma SW, StrainJJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect?. *Free Radical Biology & Medicine* 44, 1217-1231, 2008.
- Çimen MYB. Free radicals metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* 390(1-2), 1-11, 2008.
- Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JMH, Rice GE. Glucose-induced release of tumor necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 18, 921-927, 2001.
- Cross JC. Placental function in development and disease. *Reproduction Fertility and Development* 18, 71-76, 2006.
- Damasceno DC, Volpato GT, Calderon IMP, Rudge MVC. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Animal Reproduction Science* 72, 235-244, 2002.
- De Fronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5, 177-269, 1997.
- Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 30(2), 20-26, 2007.
- Diamant YZ, Metzger BE, Freikel N, Shafir E. Placental lipid and glycogen content in human and experimental diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 144,5-11,1982.
- Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic R, Djordjevic R, Grubor-Lajsic G. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity

- and lipid peroxidation products. The journal of maternal-fetal and neonatal medicine. 16, 367-372, 2004.
- Dröge W. Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47-86, 2002.
- Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43,1528-1533, 2000.
- Ferreira ALA, Machado PEA, Matsubara LS. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (6), 689-694,1999.
- França, PHOL. Avaliação da Genotoxicidade de Ratas com Diabete de Diferentes Intensidades Glicêmicas (tese doutorado). Botucatu (SP): Univ. Estadual Paulista, 2008
- Gelardi NI, Cha CJM, Oh W. Glucose metabolism in adipocytes of obese offspring of mild hyperglycemic rats. *Pediatr Res* 28, 641-645, 1990.
- Heinze E, Vetter U. Skeletal growth of fetuses from *streptozotocin* diabetic rat mothers: in vivo and in vitro studies. *Diabetologia* 30,100-103, 1987.
- Herr RR, Eble TE, Bergy ME. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot Annu* 1959-60; 7:236-40.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74(1), 214-226. 1976.
- Jain SK, Mohandas N, Clark MR, Shobet SB. The effect of malonyldialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and ⁵¹Cr-survival of erythrocytes. *Br. J. Haematol.* 53(2), 247-252, 1983.

- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Human Reproduction Update* 12(6), 747-55, 2006.
- Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol.* 143, 44-67. 1987.
- Kamath U, Rao G, Raghothama C, Rai L, Rao P. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatr* 87,676-679, 1998.
- Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 30010-30018, 2002.
- Karunanayake EH, Baker JR, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (¹⁴C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia* 12,123-128,1976.
- Kinalska M, Śledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Zarzycki W, Kinalska I. Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Horm Metab Res* 33, 227-230, 2001.
- Kinalska M, Telejko B, Kowalska I, Urban J, Kinalska I. The evaluation of lipid peroxidation products and antioxidative enzymes activity in cord blood and placental homogenates of pregnant diabetic women. *Ginekol Pol* 70(2), 57-61, 1999.
- Kitani K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Assessing the effects of deprenyl on longevity and antioxidant defenses in different animal models. *Ann N Y Acad Sci.* 854,291-306, 1998.

- Ledoux SP, Woodley SE, Patton NJ, Wilson GL. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell. Alterations in DNA. *Diabetes* 35,866-872, 1986.
- Lopez-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res* 4,107-118, 2003.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with The Folin Phenol Reagent. *The journal of biological chemistry* 193(1), 265-275, 1951.
- McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244(22), 6056-63, 1969.
- Merzouk H, Madane S, Boualga A, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Age-related changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Lipid Res* 42, 1152-1159, 2001.
- Merzouk H, Madane S, Chabani Sari D, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* 98, 21-30, 2000.
- Merzouk H, Madani S, Hichami A, Prost J, Montairou K, Belleville J. Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring *streptozotocin*-induced rats. *Lipids* 37, 773-781, 2002(a).
- Merzouk H, Madani S, Hichami A, Prost J, Montairou K, Belleville J, Kahn NA. Age-related changes in fatty acids in obese offspring of *streptozotocin*-induced diabetic rats. *Obes Res* 10(7), 703-714, 2002(b).

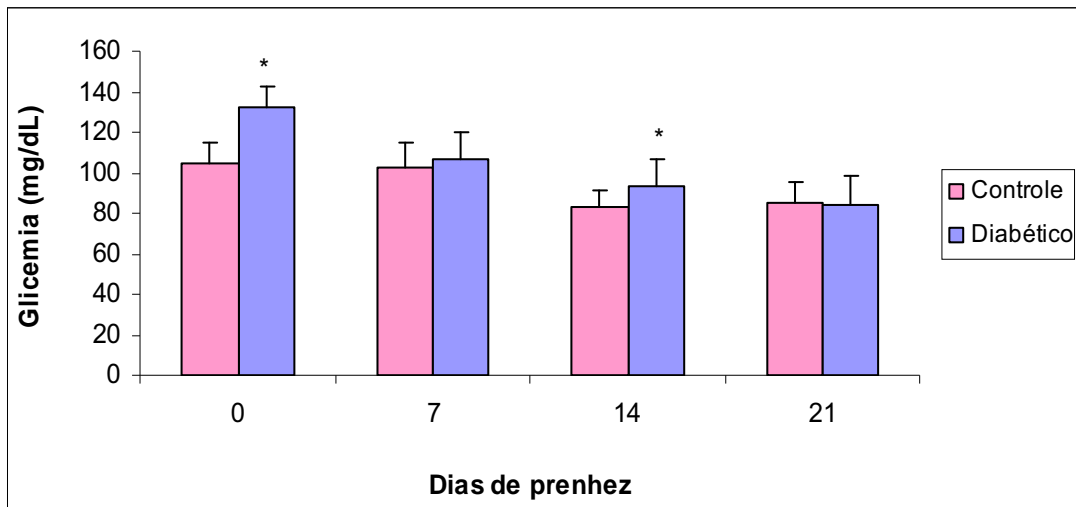
- Movassat J, Saulnier C, Portha B. Insulin administration enhances growth of the beta-cell mass in *streptozotocin*-treated newborn rats. *Diabetes* 46,1445-1452, 1997.
- Mulay S, Philip A, Solomon S. Influence of maternal diabetes on fetal rat development: alteration of insulin receptors in fetal liver and lung. *J Endocrinol* 98, 401-410, 1983.
- Murali B, Goyal RK. Improvement in insulin sensitivity by losartan in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats. *Pharmacol Res* 44(5), 385-389, 2001.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 122(4), 369-82, 2004.
- Oh W, Gelardi NL, Cha CJ. Maternal hyperglycemia in pregnant rats: Its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring. *Metabolism* 37, 1146-1151, 1988.
- Oh W, Gelardi NL, Cha CJM. The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatric Res* 29, 606-610, 1991.
- Orhan H, Önderoglu L, Yücel A, Gönül Sahin. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 267, 189-195, 2003.
- Paşaoğlu H, Banu S, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J. Exp. Med.* 203, 211-218, 2004.
- Plagemann A, Harder T, Janert U, Rake A, Rittel F, Rohde W, Dorner G. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Dev Neurosc* 21,58-67, 1999.

- Portha B, Kergoat M. Dynamics of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozocin diabetes induced in the newborn rat. *Diabetes* 34(6), 574-579, 1985.
- Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of *streptozotocin* in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23(11), 889-895, 1974.
- Portha B, Picon L, Rosselin G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17(6), 371-377, 1979.
- Portha B, Serradas P. Improvement in glucose-induced insulin secretion in diabetic rats after long-term gliclazide treatment: a comparative study using different models of non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin. *Am J Med.* 90(6A), 15S-21S, 1991.
- Rajdl D, Racek J, Steinerová, Novotny Z, Stožický, Trefil L, Siala K. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiol Res* 54, 429-436, 2005.
- Richards RS, Roberts TK, Dunstan RH, McGregor NR. Erythrocyte antioxidant systems protect cultured endothelial cells against oxidant damage. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46,857-865, 1998.
- Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 216-222, 2003.
- Simmons RA. Developmental origins of diabetes: The role of oxidative stress. *Free Radicals Biology & Medicine* 40, 917-922, 2006.

- Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, Merzouk H, Khan NA. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin Sci* 109, 287-295, 2005.
- Takehara Y, Yoshioka T, Sasaki J. Changes in the levels of lipoperoxide and antioxidant factors in human placenta during gestation. *Acta Med Okayama* 44, 103-111, 1990.
- Tames F, Mackness M, Arrol S, Laing I, Durrington P. Nonenzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis* 93, 237-244, 1992.
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgem J, Lenzen. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1742, 1997.
- Triadou N, Portha B, Picon L, Rosselin G. Experimental chemical diabetes and pregnancy in the rat. *Diabetes* 31, 75-79, 1982.
- Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano N, Fukumoto H et al. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. *Metabolism* 37(11), 1040-1044, 1988.

Conflitos de interesse

Não há qualquer conflito de interesse com relação aos dados deste manuscrito.



*Dados mostrados como média \pm desvio-padrão. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle (*teste t).

Figura 1. Níveis glicêmicos (mg/dL) nos dias 0, 7, 14 e 21 de prenhez de ratas não diabéticas (controle) e com diabetes (STZ) induzido no período neonatal.

Tabela 1. Atividades de superóxido dismutase (SOD), glutaciona-peroxidase (GSH-Px) e de glutaciona-redutase (GSH-Rd) e concentrações de grupo tióis e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hemáceas lavadas.

Marcadores	Controle (não-diabético)	Diabético (diabete moderado)
	(n=15)	(n=15)
TBARS (nM/gHb)	150,76 ± 48,64	205,72 ± 43,73
SOD (UI/mgHb)	5,64 ± 3,91	5,97 ± 2,49
TIÓIS (µM/gHb)	58,79 ± 23,15	88,30 ± 23,05
GSH – Px (UI/gHb)	0,55 ± 0,17	1,03 ± 0,21*
GSH – Rd (UI/mgHb)	4,33 ± 1,56	6,56 ± 1,50

* *Dados mostrados como média ± erro-padrão (SD)* p<0.05 comparado ao grupo controle – distribuição inversa normal gama.*

Tabela 2. Atividades enzimáticas de SOD e catalase e concentrações de GSH-t, TBARS e SH no sobrenadante em homogenato de placentas.

Marcadores	Controle (não- diabético)	Diabético (Diabete moderado)
	(n=15)	(n=15)
TBARS (mol/L)	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
SOD (UI/mg proteína)	0,73 ± 0,05	0,70 ± 0,06
CAT (UI/mg proteína)	0,34 ± 0,03	0,48 ± 0,04*
GSH (nmol/mg proteína)	1,26 ± 6,98	1,22 ± 1,10
SH precipitado (mol/L)	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00

* *Dados mostrados como média ± erro-padrão (SD). * p<0.05 comparado ao grupo não-diabético – teste t - Student.*

Anexos
