



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

Thaigra de Sousa Soares Jardim

**Análise dos parâmetros bioquímicos sob
influência da hiperglicemia intraútero e da dieta
hiperlipídica no período pós-natal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em: Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Área de concentração: Ciências da Saúde).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

**Botucatu
2019**

Thaigra de Sousa Soares Jardim

Análise dos parâmetros bioquímicos sob influência
da hiperglicemia intraútero e da dieta hiperlipídica
no período pós-natal.

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em: Ginecologia,
Obstetrícia e Mastologia (Área de
concentração: Ciências da
Saúde)

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

Botucatu
2019

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

Soares, Thaíra de Sousa.

Análise dos parâmetros bioquímicos sob influência da hiperglicemia intraútero e da dieta hiperlipídica no período pós-natal / Thaíra de Sousa Soares. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Gustavo Tadeu Volpato

Capes: 40101150

1. Desenvolvimento fetal. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Hiperglicemia. 4. Estresse oxidativo. 5. Lipídeos.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica; estresse oxidativo; hiperglicemia; perfil lipídico; programação fetal.

Dedicatória

Aos meus pais, Matusalém Ribeiro Soares e Luci Antônia de Sousa Soares. Um pedreiro e uma dona de casa que tinham medo de não me “formarem”, hoje estou aqui por vocês e vocês conseguiram mais do que imaginavam: agora preparo-me para a defesa de doutorado. Confesso que a caminhada não foi fácil, por vezes foi longa e dolorosa, mas eu sempre tive vocês comigo, em nenhum momento vocês mediram esforços para que eu pudesse realizar meu sonho. Me ensinaram que eu era capaz (mesmo quando eu estava desacreditada), a não negligenciar os meus valores e meus ideais, por me darem a maior força nos meus projetos, por me ajudarem a alcançar as minhas metas, por me darem não apenas as mãos nos momentos mais difíceis, pelas palavras que muitas vezes não queria ouvir, mas que eu precisava. Pela confiança que em mim depositaram. Pelo amor incondicional, carinho e dedicação que recebi todos esses anos. Pelo apoio, por firmarem meus passos e não me deixarem desanimar. Vocês me ensinaram não o caminho mais curto, mas sim o certo, sempre me tornando o melhor que eu poderia ser. Vocês me levaram aos lugares onde não pude ir sozinha Obrigada por me ensinarem a ser a pessoa que sou hoje. Esse trabalho não seria possível sem vocês.

Agradecimentos

Agradeço a Deus que é meu ajudador, meu Pai Celestial de quem eu sou plenamente dependente. Especialmente nesses últimos 4 anos pude sentir o Seu cuidado. Mesmo eu não merecendo me presenteou com a aprovação no doutorado, com um esposo segundo o Seu coração e o casamento dos sonhos, me agraciou com um lar, protegeu meus pais, sogros, cunhados, cunhadas, sobrinho e familiares como a menina dos Seus olhos, me permitiu passar por situações inimagináveis e me sustentou até superá-las, me guardou debaixo de Suas asas em todas as viagens, ouviu o meu choro enquanto estava só me sustentando em todo o momento, e quando pensei que era o fim me mostrou que Seus planos são imensamente maiores do que os meus, eu só não entendo, mas hoje, aceito e confio. Diversas foram as vezes que me senti impotente e fraca, então o Senhor me fortaleceu, porque dEle, para Ele e por meio dEle são todas as coisas e somente a Ele sejam a honra, a glória e o louvor para todo o sempre.

Ao meu esposo, Vinícius, de quem me orgulho e sou grata. Grata por ter você ao meu lado, caminhando comigo, isso já bastaria. Mas você foi além e diversas vezes se sacrificou por mim, teve paciência e me ensinou sobre paciência, renunciou estar junto, deixou seu trabalho e pegou férias para me acompanhar, deixou de fazer seu TCC para me ceder seu computador duarente um ano inteiro, pelas vezes que mesmo sem entender ouviu as explicações do trabalho, minhas reclamações e choros, pelas orações e vezes que me abençoou, por ser servo e sacerdote do nosso lar. Muito obrigada pelo seu zelo, carinho e cuidado, por ter trilhado ao meu lado independente do caminho que escolhi, porque você escolheu sonhar os meus sonhos, eu te amo todos os dias.

Logan e Mel, meus filhos de quatro patas, que me recebem alegremente todas as vezes que chego em casa, deitam perto de mim durante os dias e noites de escrita, carinhosamente se aquietam quando fico triste, correm com “sorrisos” querendo brincar ou insistentemente pedem chamego quando estou ocupada

demais, embora não saibam ler ou falem como a gente, eles fazem parte dessa história.

À professora Débora que mesmo sem me conhecer decidiu orientar “as meninas do Gustavo”. Sei que o desafio foi grande: orientar à distância, experimento insistente em dar erro, às vezes dificuldade de comunicação, mas a admiração permanece pela sua integridade e honestidade, por abraçar e fazer o trabalho que ama, pelo seu conhecimento, esforço, por ser mulher, esposa, mãe, professora e orientadora. Nunca me esquecerei das coisas que me ensinou (e não foram poucas), do zelo em saber onde estava ficando, se estava comendo ou tinha roupa de frio. Muito obrigada por me apoiar quando passei no seletivo para professor, por entender minhas dificuldades e me ajudar a superar, com a senhora aprendi a me superar, fazer o meu melhor e a ser melhor.

Ao meu coorientador, amigo e padrinho, Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato, a quem muito admiro e tenho como exemplo, por todo o conhecimento compartilhado, pela dedicação, por ter me socorrido nas horas de desespero e, pela paciência que teve em todos os momentos, afinal já são quase 10 anos. Por ter me adotado e me ajudado a alcançar meus objetivos e me ensinado o que é ser pesquisador, cientista e “paifessor”.

Obrigada, Nágilla e Loyane, vocês sem sombra de dúvida foram os melhores presentes que a biomedicina me deu. Vocês foram meu braço esquerdo desde a graduação, nas disciplinas, estudos para provas, trabalhos, experimentos, entramos na graduação, mestrado e doutorado juntas e seguiremos juntas. Vocês são minhas amigas-irmãs com quem posso contar pra engordar ou emagrecer, para cesáreas ou discussão, para faxina ou festa no laboratório, para iniciarmos um novo projeto e sofrer na hora de escrever. Obrigada por esses 10 anos de amizade e pelos próximos que virão.

Rafa, a enfermeira mais biomédica que conheço hahaha. Muito obrigada pela companhia desde o nosso experimento de graduação, trabalhamos em conjunto nos nossos experimentos de mestrado, e agora no doutorado. Entramos juntas, e estamos vencendo. Nesses anos foram muitas viagens, trabalhos,

aprendizado, descobertas, e você ganhou um presentinho, um pacotinho de amor (Miguel), obrigada por toda a partilha desde artigos até o bolo de cenoura.

À Vêronyca de Paula Gonçalves, por ter mudado seus planos e decido a nos ajudar em um momento tão difícil e que tanto precisamos.

À Giovana Vesentini, pela dedicação, paciência, pelo tempo e ensinamentos.

À profa. Dra. Yuri Karen Sinzato, pela paciência que teve em me ensinar e guiar, por partilhar conhecimentos, pela amizade e pelo exemplo de cientista.

À minha família FISIOTOX (professores Gustavo Tadeu Volpato, Kleber Eduardo de Campos e Madileine F. Américo e todos os alunos), não poderei citar todos os nomes (muitos passaram por lá nesses quase 10 anos e muito me ensinaram), agradeço especialmente à Mariana Pirani, Larissa Lopes, Cristielly Barbosa, Vanessa Caruline, Maysa Souza e Ana Paula pelos cafés e bolos, pela companhia, amizade, incentivo e ajuda nas discussões, reuniões e experimentos.

Aos meus colegas e amigos do LAPGO, aos que já saíram e os que ainda permanecem, obrigada por me acolherem e permitir que eu fizesse parte também desta família.

Aos meus amigos Eduardo Kloppel, Carolina A. Miranda, Verônyca P. Gonçalves e Rosa Jacinto Volpato por me acolher, pela amizade e companheirismo.

À direção e coordenações da Escola Técnica Estadual de Barra do Garças (ETE-BG) pelo incentivo, credibilidade, confiança, dispensas, carinho, torcida e admiração. Aos colegas professores das mais diversas áreas (enfermeiros, farmacêuticos, odontólogos, contadores, administradores, engenheiros civis, arquitetos, inglês, português, agrônomos, veterinários) vocês me acolheram tão bem, me ensinaram tanto a: crescer, ser melhor, admirar, amar nossa profissão, compartilhar (lanche, conhecimento – didático, burocrático e de vida). Gratidão a vocês.

Aos alunos dos cursos técnicos em Análises Clínicas turmas 2016 e 2018 e Enfermagem 2018 pelo carinho, companheirismo, compreensão, ensinamentos, pelas memórias incríveis que vocês deixaram registradas em mim,

pelas tantas noites em que estivemos juntos, pelo conhecimento compartilhado e crescimento mútuo.

Aos Assistentes de Suporte Acadêmico (ASA) da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente aos Srs. Danilo Chaguri, Carlos Roberto Gonçalves de Lima, José Márcio Cândido e Jurandir Antônio, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, em especial ao Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), por todos os recursos dispensados a mim.

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 Cagliari, obrigada por ser sempre solícita e pelos auxílios prestados.

Ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, pelo serviço prestado. Em especial ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, pelos cálculos e análises estatísticas para os projetos que correram em paralelo a esta revisão sistemática.

À equipe da biblioteca da Unesp de Botucatu pela confecção da ficha catalográfica e outros auxílios realizados.

Às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, aos que me sustentaram em oração e torceram por mim.

Aos animais que participaram deste experimento, sem eles este trabalho não existiria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	1
Considerações Iniciais.....	2
Apresentação Científica.....	3
Graduação.....	3
Mestrado.....	4
Doutorado.....	6
Capítulo 2.....	20
Resumo.....	22
Introdução.....	23
Materiais e Métodos.....	25
Resultados.....	30
Discussão.....	34
Conclusão.....	37
Agradecimentos.....	37
Financiamento.....	37
Referências.....	38
Anexo 1.....	47
Anexo 2.....	48
Anexo 3.....	49
Anexo 4.....	50

Capítulo 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este estudo faz parte de um projeto mais amplo intitulado “Avaliação de descendentes expostas ao diabetes moderado intrauterino, submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez” (Protocolo CEUA 1218/2017). Esse projeto tem financiamento da FAPESP (Processo número 2016/25207-5 com vigência 01/07/2018 a 30/06/2020).

No primeiro projeto elaborado como sendo o doutorado de Thaígra de S. Soares Jardim, a metodologia contemplava os estudos sobre perfil lipídico e estresse oxidativo referente os animais do projeto completo descrito acima. Para obtenção de filhas de diabéticas (FDmod) com idade adulta, são necessários pelo menos 180 dias (meio ano). Ao longo deste experimento, foi observado que as ratas FDmod apresentaram dificuldades para acasalamento, o que retardou o tratamento desses animais, bem como o experimento como um todo. Após o segundo ano de tentativas frustradas para obtenção de ratas prenhes, advindas de ambiente intrauterina hiperglicêmico e alimentadas com dieta hiperlipídica, a aluna obteve uma pequena amostragem de animais prenhes. Estes animais foram tratados, mas durante o experimento, todos os animais prenhes e não-prenhes foram a óbito em virtude de uma contaminação bacteriana, confirmada por exames específicos realizados no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ – Unesp. Desta forma, a aluna precisou reiniciar todo o experimento para obtenção de todos os grupos experimentais. No entanto, para apresentação desta tese (Capítulo 2) constam apenas os dados de animais não-prenhes. Os resultados sobre prenhez e tratamento com vitamina D e/ou cálcio continuam em andamento e estarão sob a responsabilidade desta aluna e de outras estudantes envolvidas no projeto completo para que sejam tabulados, analisados, discutidos e, posteriormente, publicados em revista de âmbito internacional.

APRESENTAÇÃO CIENTÍFICA

GRADUAÇÃO

Ingressei no curso de Biomedicina da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) do Campus Universitário do Araguaia (CUA) em 2009. A opção pelo curso foi algo subjetivo em função do gosto pela disciplina de Biologia no ensino médio. Embora inicialmente eu quisesse cursar Medicina (talvez pelo bom retorno financeiro), no decorrer do curso as possibilidades e a riqueza do campo profissional foram aparecendo na medida que adquiria gosto pelo estudo. Neste sentido, foi decisiva a ação do professor Dr. Gustavo Tadeu Volpato, que ao final da disciplina de Histologia e Embriologia se dispôs a me orientar para realização de pesquisa de iniciação científica.

Durante a graduação, tive a oportunidade de participar do Projeto de Extensão Pró Saúde Universitária: conhecer para se proteger sob orientação da professora Lucélia Campelo de Albuquerque Moraes, realizar duas pesquisas de iniciação científica e a monografia para conclusão de curso, além de participar de diversos eventos científicos, apresentando trabalhos.

Iniciação científica e monografia:

1- Repercussões materno-fetais de ratas tratadas com *Himatanthus sucuuba* do dia 0 ao 14o. da prenhez (Auxílio Pesquisa financiado pela FAPEMAT e Projeto Universal CNPq (Processo No. 453362/2009 sob a coordenação do Prof. Dr. Gustavo T. Volpato). Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de *Himatanthus sucuuba*, administrado durante o período de pré-implantação e de organogênese, sobre parâmetros maternos e fetais de ratas. Com este projeto, tive minha primeira bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) sob orientação do Prof. Gustavo T. Volpato.

2- Avaliação de ratos diabéticos tratados com extrato aquoso de folhas de *Hancornia speciosa* (Projeto de Auxílio Pesquisa Universal financiado pelo CNPq - Processo No. 472378/2011-2, sob coordenação do Prof. Gustavo T. Volpato). Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito hipoglicemiante de

Hancornia speciosa em ratas com diabetes induzido por *Streptozotocin*. Este projeto proporcionou minha segunda bolsa de Iniciação Científica (PIBIC), também sob orientação do Prof. Gustavo T. Volpato.

3- Estudo dos efeitos abortivos e teratogênicos do tratamento de ratas prenhes com *Croton urucurana* (sangue-de-dragão). Este trabalho visou avaliar os efeitos do extrato de *Croton urucurana* (sangue-de-dragão), administrado durante a prenhez, sobre parâmetros maternos e fetais de ratas. Este projeto constituiu meu trabalho de conclusão de curso no formato de uma Monografia para conclusão do Curso de Biomedicina na UFMT, sob orientação do Prof. Gustavo T. Volpato.

Eventos científicos:

1- Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Himatanthus sucuuba* na prenhez de ratas Wistar: repercussões maternas. 14º Encontro Nacional de Biomedicina, 2011, Botucatu - SP.

2- Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Himatanthus sucuuba* na prenhez de ratas Wistar: repercussões maternas. X Workshop de Plantas Medicinais, 2012, Botucatu - SP.

3- Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Himatanthus sucuuba* na prenhez de ratas Wistar: repercussões fetais. X Workshop de Plantas Medicinais, 2012, Botucatu - SP.

MESTRADO

O ingresso no Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMT/CUA (Nível: Mestrado), sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato, foi decorrente da produtividade advinda das pesquisas realizadas durante minha Graduação em função dos estágios de Iniciação Científica. A dissertação teve por título “Efeitos do exercício físico em ratas com diabéticas moderado: Repercussões maternas, imunológicas e fetais” (Auxílio Pesquisa FAPEMAT e Projeto Universal do CNPq - Processo No. 160425/2014 sob

coordenação do Prof. Dr. Gustavo T. Volpato). Além da dissertação, pude contribuir em diversos outros projetos que estão em andamento no Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FisioTox), bem como participar e apresentar trabalhos em eventos científicos como: 1) Perfil bioquímico do tratamento do extrato de *Hancornia speciosa* em ratas diabéticas. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2014, Goiânia - GO; 2) Efeitos do extrato de *Croton urucurana* na prenhez de ratas Wistar: Repercussões maternas. I Congresso de Biomedicina do Araguaia, 2014, Barra do Garças - MT.

Além disso, neste período, participei da organização do Curso de Extensão “Tópicos teórico-prático de Fisiologia e Toxicologia Reprodutiva” em 2014 e coorientei o aluno Iuri Francisco Júnior no Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) para obtenção de seu título na graduação em Biomedicina/UFMT com projeto intitulado “Efeito da obesidade transgeracional no desempenho materno e na frequência de anomalias fetais”. Neste período, também participei como membro de diversas bancas de TCC e ministrei aulas para o Curso de Graduação na disciplina de Estágio Docência como convidada.

Tive trabalhos premiados trabalhos em eventos científicos:

1- Menção Honrosa ao trabalho: "Avaliação de ratos diabéticos tratados com extrato aquoso de folhas de *Hancornia speciosa*.", I Congresso de Biomedicina do Araguaia em 2014.

2- Menção Honrosa ao trabalho: "Efeitos do extrato de *Croton urucurana* na prenhez de ratas Wistar: Repercussões maternas.", I Congresso de Biomedicina do Araguaia em 2014.

O término de minha Dissertação se deu no dia 18 de fevereiro de 2015.

DOUTORADO

Em março de 2015, iniciei o Doutorado no programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (PGGOM), Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), da Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, sob a orientação da Profa. Dra. Débora C Damasceno e coorientação do Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato.

Durante o Doutorado, desenvolvi parte do projeto em Botucatu e outra parte na UFMT. Além das atividades teórico-práticas relacionadas ao projeto do Doutorado, participei das disciplinas do PGGOM e seminários dos laboratórios, ministrei aulas, participei e apresentei trabalhos em eventos científicos nacionais e internacionais com recebimento de prêmios, desenvolvi e redigi outros projetos e trabalhos de pesquisa junto alunos de ambos os laboratórios (UNESP e da UFMT) e fui convidada para participar em bancas de TCC da UFMT.

Abaixo, seguem os artigos publicados e atividades desenvolvidas no decorrer do Doutorado:

Artigos publicados:

- 1- **Soares, T.,** Carmo, N. O. L., Gama, L. A., Moraes-Souza, R. Q., Resende, N. M. Cisticercose, uma doença negligenciada, mas não esquecida: uma revisão. Revista Panorâmica online, v. 19, 2015.



Revista Panorâmica On-Line. Barra do Garças – MT, vol. 19,
p. 132 - 147, ago./dez. 2015. ISSN - 2238-921-0

CISTICERCOSE, UMA DOENÇA NEGLIGENCIADA, MAS NÃO ESQUECIDA: uma revisão

Thaíra de Sousa Soares¹
Nágilla Orleanne Lima do Carmo²
Rafaelanne Queiroz de Moraes Souza³
Loyane Almeida Gama⁴
Nathália Maria Rezende⁵

Resumo:

A cisticercose ainda hoje é um grande problema de saúde pública em muitas partes do mundo em desenvolvimento. A doença ocorre quando os seres humanos se tornam hospedeiros intermediários de *Taenia solium* por ingestão de água ou alimentos contaminados e auto-infecção. É um problema de saúde pública em várias partes do mundo, como China, sudeste asiático, Índia, África subsaariana e América Latina, incluindo o Brasil. Os fatores que contribuem para essa endemia incluem má higiene pessoal e precariedade no saneamento das moradias e no saneamento público. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão sistemática sobre a cisticercose a fim de determinar medidas profiláticas e de controle desta endemia. Os cisticercos podem ser encontrados comumente no sistema nervoso central, olho, tecidos subcutâneos, músculo, boca, pulmão e mais raramente coração e ossos, sendo a neurocisticercose a forma mais frequente e endêmica da doença. Nesse caso, os cisticercos podem ser localizados no parênquima cerebral, espaço subaracnóide, sistema ventricular e medula espinal. Atualmente há diversas ferramentas de diagnóstico, como exames radiológicos, sorologia e detecção imunológica, mas o padrão ouro continua sendo demonstração da presença de larva parasitária no tecido. Após o diagnóstico, a abordagem terapêutica a ser adotada depende do estágio dos cistos e inclui desde as drogas usuais (praziquantel e albendazol) as novas drogas (como EpiBr), desenvolvimento de vacinas e até procedimentos cirúrgicos. Embora o tratamento seja eficaz, a profilaxia é a única forma de erradicar a doença, a qual envolve saneamento, desenvolvimento sócio-econômico-cultural, fiscalização e controle de migração.

Palavras-chave:

Cisticercose. Neurocisticercose. *T. solium*. Parasito.

CYSTICERCOSIS, NEGLECTED DISEASE BUT NOT FORGOTTEN:

¹ Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: thaira.sousa@ufmt.br

² Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: nagillaorleanne@hotmail.com

³ Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: rafaelannequeiroz@hotmail.com

⁴ Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: loyane_almeida@hotmail.com

⁵ Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: nathy_rezende@yahoo.com.br

- 2- **de Sousa Soares, T., Damasceno, D. C., Kempinas, W. D. G., Resende, F. M. C., Correa dos Santos, M. A., Hiruma-Lima, C. A., & Volpato, G. T. (2015). Effect of *Himatanthus sucuuba* in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 104(5), 190-195.**

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Birth Defects Research (Part B) 104:190–195 (2015)

Research Article

Effect of *Himatanthus sucuuba* in Maternal Reproductive Outcome and Fetal Anomaly Frequency in Rats

Thaígra de Sousa Soares,¹ Débora Cristina Damasceno,² Wilma De Grava Kempinas,³ Flávia Mayara Campos Resende,¹ Maria Aparecida Correa dos Santos,⁴ Clélia Akiko Hiruma-Lima,⁵ and Gustavo Tadeu Volpato^{1,2*}

¹Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil

²Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Department of Gynecology and Obstetrics, Univ Estadual Paulista_Unesp, Botucatu, São Paulo State, Brazil

³Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, Univ Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo State, Brazil

⁴Instituto Estadual de Pesquisa do Araguaí (IEPA), Araguaia State, Brazil

⁵Department of Physiology, Institute of Biosciences of Botucatu, Univ Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo State, Brazil

The aim of this study was to evaluate the effect of *Himatanthus sucuuba* on the maternal reproductive outcome and fetal anomaly incidence in rats. Pregnant rats were randomly divided into three experimental groups as follows: Control = treated with water (vehicle), treated 250 = treated with *H. sucuuba* at dose 250 mg/kg, and treated 500 = treated with *H. sucuuba* at dose 500 mg/kg. The rats were orally treated, by gavage, with *H. sucuuba* or vehicle (water) during preimplantation and organogenic period (from gestational day 0–14). At day 21 of pregnancy, all rats were killed to obtain maternal–fetal data. The treatment with *H. sucuuba* at dose of 250 mg/kg caused reduction in placental efficiency and an increase preimplantation loss rate and placenta weight compared with the control. The treated 500 group presented a significant decrease in maternal weight gain, maternal weight gain minus gravid uterus weight, fetal weight, and placental efficiency compared with the control. In this group, there was a decrease in body weight at day 20 of pregnancy and metacarpus ossification and an increase in the preimplantation loss rate and skeletal anomalies compared with other groups. *Himatanthus sucuuba* extract caused intrauterine growth restriction, preimplantation loss, and developmental delay in the high doses tested. *Birth Defects Res (Part B)* 104:190–195, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: *Himatanthus sucuuba*; pregnancy; reproductive outcome; malformation; rats

INTRODUCTION

In traditional medicine, women are the most frequent users of herbal medicines (Hall et al., 2011). Herbal medicines are used by women to treat many reproductive health problems, such as menstrual problems, infertility, and discomforts and dysfunctions of pregnancy, labor, and menopause (Kennedy et al., 2013). These plants are consumed mostly based on personal experience or traditional knowledge, and in most cases, it is unclear how safe their use is during pregnancy (Ollace et al., 2014).

Himatanthus sucuuba (Spruce) Woodson is an arboreal plant belonging to the Apocynaceae family, which grows in the Amazon regions of Colombia, Peru, and Brazil. This plant is also known as “janaguba,” “sucuba,” “sucuba,” and “Bellaco-Caspi” (Villegas et al., 1997; De

Miranda et al., 2000; Silva et al., 2007). Latex and stem bark of *H. sucuuba* consist of triterpenes, α-amyrin, and lupool esters in addition to the iridoids, plumericin, and isoplumericin in chemical studies (De Miranda et al., 2000; Wood et al., 2001). It has been used in folk medicine as vermifuge, antitumor, antifungal, analgesic, antilucer, and antianthrisc drug (Ellsabecky and Castilhos, 1990; Villegas et al., 1997; Silva et al., 2007). Studies reported

*Correspondence to: Gustavo Tadeu Volpato, Laboratório PatóTox, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde—UFMT, Av. Valdeon Vargas, 6150, 78600-000, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil. E-mail: gvolpato@yahoo.com

Grant sponsor: FAPMAT/Brasil; Grant number: 451362/2009.

Received 12 June 2015; Accepted 09 August 2015

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com/journal/bdr) DOI: 10.1002/bdrb.21152

- 3- Moraes-Souza, R. Q., Reinaque, A. P., Soares, T. S., Silva, A. L. T., Giunchetti, R. C., Takano, M. A., et al., (2017). Safety evaluation of a vaccine: Effect in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats using a leishmanial vaccine as a model. PLoS one, 12(3), e0172525.



RESEARCH ARTICLE

Safety evaluation of a vaccine: Effect in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats using a leishmanial vaccine as a model

Rafaelle Q. Moraes-Souza^{1*}, Ana Paula Reinaque^{2*}, Thaígra S. Soares¹, Ana Luíza T. Silva³, Rodolfo C. Giunchetti², Maria A. S. Takano⁴, Milena A. Akamatsu⁴, Flávia S. Kubrusly⁴, Fernanda Lúcio-Macarin⁴, Isaias Rêw⁴, Dmitri Iourtov⁴, Paulo Lee Ho⁴, Lilian L. Bueno², Ricardo T. Fujihara², Gustavo T. Volpato^{1*}

1 Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT) - Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil, **2** Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites, Department of Parasitology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais (UFMG) Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, **3** Laboratory of Cell-Cell Interactions, Morphology Department, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Division of Technological Development and Production (DDTP), Butantan Institute, São Paulo, Brazil



OPEN ACCESS

Citation: Moraes-Souza RQ, Reinaque AP, Soares TS, Silva ALT, Giunchetti RC, Takano MAS, et al. (2017) Safety evaluation of a vaccine: Effect in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats using a leishmanial vaccine as a model. PLoS ONE 12(3): e0172525. doi:10.1371/journal.pone.0172525

Editor: Henk D. F. H. Schallig, Academic Medical Centre, NETHERLANDS

Received: August 26, 2016

Accepted: February 6, 2017

Published: March 1, 2017

Copyright: © 2017 Moraes-Souza et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by: Rafaelle Q. Moraes-Souza received CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) scholarship; Ana Paula Reinaque received CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) - CINTER allowance; part of this study was supported by grants from FAPEMIG

* These authors contributed equally to this work.

* rquimada@ufmt.br

Abstract

While the immunogenic potential of the vaccination against infectious diseases was extensively shown, data on the safety assessment of recombinant proteins in vaccine formulations administered during pregnancy are still scarce. In the current study, the antigenicity of a vaccine against leishmaniasis (based on *Leishmania braziliensis* recombinant protein peroxidoxin) during pregnancy and possible maternal reproductive outcomes and fetal anomalies after immunization with a leishmanial vaccine or adjuvant alone (*Bordetella pertussis* derived MPLA adjuvant) were assessed. Rats were mated and allocated in three groups: **Control**—rats received saline; **Adjuvant**—rats received the adjuvant MPLA, and **Vaccine**—rats received the combination of MPLA and peroxidoxin. The administration was subcutaneously at the dorsal region, three times (days 0, 7, 14 of pregnancy). On day 21 of pregnancy, all rats were bled for biochemical and immunological measurements. The gravid uterus was weighed with its contents, and the fetuses were analyzed. The immunization with peroxidoxin induced a significant production of circulating IgG levels compared to other groups but caused a significant in post-implantation loss (14.7%) when compared to Control (5.0%) and Adjuvant (4.4%) groups. Furthermore, a significantly high rate of fetal visceral anomalies, such as hydronephrosis and convoluted ureter, was also observed in animals that received vaccine when compared to Control or Adjuvant groups. These data indicate the importance of safety evaluation of vaccines during pregnancy and the limited use of peroxidoxin administration during pregnancy. More importantly, the safety monitoring of immunization with MPLA derived from *Bordetella*

- 4- Afiune, L. A. F., Leal-Silva, T., Sinzato, Y. K., Moraes-Souza, R. Q., Soares, T. S., Campos, K. E., et al., (2017). Beneficial effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower aqueous extract in pregnant rats with diabetes. PLoS one, 12(6), e0179785.



RESEARCH ARTICLE

Beneficial effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower aqueous extract in pregnant rats with diabetes

Luana Alves Freitas Afiune¹, Thaís Leal-Silva¹, Yuri Karen Sinzato², Rafailiane Quelroz Moraes-Souza^{1,2}, Thaígra Sousa Soares^{1,2}, Kleber Eduardo Campos¹, Ricardo Toahio Fujiwara³, Emilio Herrera⁴, Débora Cristina Damasceno², Gustavo Tadeu Volpato^{1,2*}

1 Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil, **2** Gynecology, Obstetrics and Maternity Graduate Course, Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Univ Estadual Paulista, Unesp, Botucatu, São Paulo State, Brazil, **3** Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, **4** Department of Biochemistry and Molecular Biology, University CEU San Pablo, Madrid, Spain

* gvolpato@yahoo.com



OPEN ACCESS

Citation: Afiune LAF, Leal-Silva T, Sinzato YK, Moraes-Souza RQ, Soares TS, Campos KE, et al. (2017) Beneficial effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower aqueous extract in pregnant rats with diabetes. PLoS ONE 12(6): e0179785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179785>

Editor: Ying-Ju Lin, China Medical University, TAIWAN

Received: February 24, 2017

Accepted: June 4, 2017

Published: June 23, 2017

Copyright: © 2017 Afiune et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Ricardo T. Fujiwara and Débora C. Damasceno received support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

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

Abstract

Purpose

The *Hibiscus rosa-sinensis* flower is widely used in Brazilian traditional medicine for the treatment of diabetes and has shown antifertility activity in female Wistar rats. However, there is no scientific confirmation of its effect on diabetes and pregnancy. The aim of this study was evaluate the effect of aqueous extract of *H. rosa-sinensis* flowers on maternal-fetal outcome in pregnant rats with diabetes.

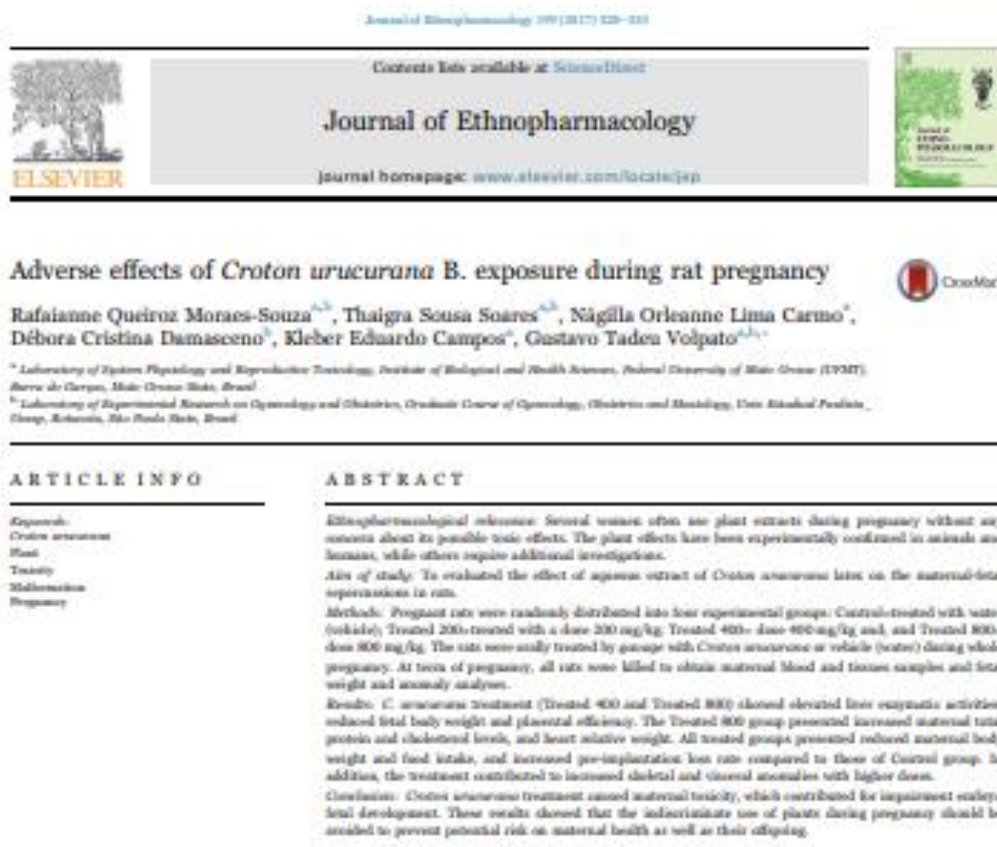
Methods

Diabetes was induced by streptozotocin (STZ, 40 mg/kg) in virgin, adult, female Wistar rats. After diabetes induction, the rats were mated. The pregnant rats were distributed into four groups (n minimum = 11 animals/group): non-diabetic, non-diabetic treated, diabetic, and diabetic treated. Oral aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* was administered to rats in the treatment groups during pregnancy. At term pregnancy, maternal reproductive outcomes, fetal parameters, and biochemical parameters were analyzed.

Results

The non-diabetic treated group showed decreased high density lipoprotein cholesterol, increased atherogenic index (AI) and coronary artery risk index (CRI), and increased preimplantation loss rate compared to the non-diabetic group. Although treatment with *H. rosa-sinensis* led to no toxicity, it showed deleterious effects on cardiac and reproductive functions. However, the diabetic treated group showed increased maternal and fetal weights,

- 5- Moraes-Souza, R. Q., Soares, T. S., Carmo, N. O. L., Damasceno, D. C., Campos, K. E., & Volpato, G. T. (2017). Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. Journal of ethnopharmacology, 199, 328-333.



1. Introduction

Medicinal plants have been widely used to treat a variety of diseases. However, the use of these plants during pregnancy may present health risks to the woman and also to her fetus (Moura et al., 2014). Certain herbs, used as abortifacients can induce embryotoxicity, fetotoxicity and/or teratogenicity when embryonic death does not occur. *Croton urucurana* Ruffin, popularly known as dragão blood, blood water, capidagui, ururuna, lacurana, tapidagui and tapidagui, is considered an abortive plant (Gargal et al., 2002). *Croton* is a large and diverse genus of Euphorbiaceae that comprises at least 800 species of the tropics and subtropics (Webster, 1993). *C. urucurana* is widespread in wetlands and riparian areas and is commonly found in southern Brazil, northern Argentina, Paraguay and Uruguay. The *C. urucurana* tree has an open canopy and bright stem, and reaches up to 15 m (Ribeiro et al., 2014).

The indigenous culture believe that *C. urucurana* shows remarkable healing properties. This plant has been extensively used in folk medicine for treatment of cancer, rheumatism, lesions, ulcers, diarrhea infections (Rao et al., 2007). Three different products from *C. urucurana* species are primarily used - the red sap or latex, stem bark and the gum exudate (Silveira et al., 2007). In male rats, Emeraúdio et al. (2005) found that the stem bark of *C. urucurana* aqueous extract showed anti hemorrhagic activity. Also in male rats, was observed an anti-diarrheal response after treatment with 600 mg/kg of *C. urucurana* latex (Gargal et al., 2001), and antifungal activity against five different dermatophytes when using *C. urucurana* sap in an in vitro study (Gargal et al., 2002). Cardoso et al. (2012), testing the acute toxicity of this plant, demonstrated that a single dose of 2000 mg/kg of *C. urucurana* bark methanol extract produced no toxicity signs in female rats, whereas doses at 50, 100 and 250 mg/kg caused reduced gastric lesions in male rats. In 2016, these same

¹ Corresponding author at: Laboratório PreCOT, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFMT, Av. Trilhes Vazão, 6390, 78069-900, Ressa de Cuiçã, Mato Grosso, Brazil. E-mail address: gtv@ufmt.br (G.T. Volpato).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.064>

Received 6 July 2016; Received in revised form 27 October 2016; Accepted 19 October 2016

Available online 20 October 2016

0378-8741/ © 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

- 6- Tadeu Volpato, G., Queiroz Moraes-Souza, R., **Sousa Soares, T.**, Leal-Silva, T., & Cristina Damasceno, D. (2017). Medicinal plants for diabetes treatment during pregnancy. *Current medicinal chemistry*, 24(4), 404-410.

404
Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.se

Current Medicinal Chemistry, 2017, 24, 404-410



**BENTHAM
SCIENCE**

REVIEW ARTICLE

Medicinal Plants for Diabetes Treatment During Pregnancy



Gustavo Tadeu Volpato^{a,b,*}, Rafaienne Queiroz Moraes-Souza^{a,b}, Thaigra Sousa Soares^{a,b},
Thais Leal-Silva^a, and Débora Cristina Damasceno^a

^aLaboratory of Systems Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil; ^bLaboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Univ Estadual Paulista Unesp, Botucatu, São Paulo State, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: March 26, 2016
Revised: July 12, 2016
Accepted: July 22, 2016

DOI: 10.2174/093952651606601000127014

Abstract: Diabetes mellitus is a syndrome of great importance that affects an increasing number of people every day. In particular, diabetes is a common and important disease during pregnancy and is marked by complications, both fetal and maternal, that increase the risks of morbidity and mortality for diabetic pregnant women and their offspring. Drugs such as insulin and hypoglycemic drugs are given to treat diabetes, but regular exercise and adequate diet have also been indicated. Furthermore, coadjutant therapies such as medicinal plants are popularly used to reduce diabetes-induced hyperglycemia, either within or outside the context of pregnancy. However, studies examining plant use for diabetes treatment are necessary to confirm its possible effects and its safety for the mother and fetus. The objective of this literature review was to conduct a survey of plant species that are utilized worldwide and their stated therapeutic uses. A literature search was performed using the terms "diabetes and pregnancy", which resulted in the identification of 31,272 articles. Of these studies, only 12 (0.038%) were related to medicinal plants, demonstrating that there has been little investigation into this issue. Of the papers analyzed in this review, half evaluated plant leaves, indicating that these scientific studies attempted to reproduce the preparations commonly used by various populations, i.e., in the form of tea. Additionally, more than 90% of studies utilized experimental animals to evaluate the maternal-fetal safety of medicinal plant substances that may potentially be dangerous for humans. Thus, once confidence levels for plant-derived substances are established based on toxicological analyses and safety is confirmed, it is possible that plants will be used to complement conventional diabetes therapies.

Keywords: *Diabetes mellitus*, pregnancy, medicinal plants, herbs, treatment, review.

1. DIABETES BY THE NUMBERS

Diabetes mellitus is a complex and chronic disease that requires continuous medical care to reduce blood glucose and multifactorial risks. It presents multiple etiologies characterized by the chronic elevation of fasting and/or post-prandial glucose due to absolute or relative defects in insulin synthesis or decreased effects of insulin [1, 2].

Diabetes is a crucially important syndrome that is becoming the epidemic of the century. Globally, an estimated 422 million adults were living with diabetes in 2014, compared to 108 million in 1980. The global prevalence (age-standardized) of diabetes has nearly doubled since 1980, rising from 4.7% to 8.5% in the adult population [3]. In the Americas, the number of individuals with diabetes was estimated at 35 million in 2000 and projected to be 64 million in 2025 [4]. However, as of 2011, that number reached 62.8 million and is expected to reach 91.1 million in 2030 [5]. Diabetes is among the ten major causes of death in Western countries, and despite progress in clinical management, its lethal consequences still cannot be prevented. In

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Systems Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, 78600-000, Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil.
Tel/Fax: ++55-66-3401-5458; E-mail: gvolpato@yahoo.com

1875-533X/17 \$58.00+.00
© 2017 Bentham Science Publishers

- 7- Pinheiro, M. S., Rodrigues, L. S., Neto, L. S., Moraes-Souza, R. Q., Soares, T. S., Américo, M. F., et al., (2017). Effect of *Bauhinia holophylla* treatment in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(1), 263-272.



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2017) 89(1): 263-272
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160690>
www.scielo.br/anabc

Effect of *Bauhinia holophylla* treatment in Streptozotocin-induced diabetic rats

MARCELO S. PINHEIRO³, LUIHARA S. RODRIGUES², LEILA S. NETO³, RAFAELIANNE Q. MORAES-SOUSA¹, THAIGRA S. SOARES¹, MADILEINE F. AMÉRICO², KLEBER E. CAMPOS¹, DÉBORA C. DAMASCENO¹ and GUSTAVO T. VOLPATO^{1,2}

¹Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso/ UFMT, Av. Václav Varjilo, 6390, 79600-000 Barra do Garças, MT, Brazil

²Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista/ UNESP, Distrito de Rubião Jr, s/n, 13618-970 Botucatu, SP, Brazil

Manuscript received on January 27, 2016; accepted for publication on November 28, 2016

ABSTRACT

Bauhinia holophylla, commonly known as “cow’s hoof”, is widely used in Brazilian folk medicine for the diabetes treatment. Therefore, the aim of this study was at evaluating the aqueous extract effect of *Bauhinia holophylla* leaves treatment on the streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes was induced by Streptozotocin (40 mg/Kg) in female Wistar rats. Oral administration of aqueous extract of *Bauhinia holophylla* leaves was given to non-diabetic and diabetic rats at a dose of 400 mg/kg during 21 days. On day 17 of treatment, the Oral Glucose Tolerance Test was performed to determine the area under the curve. At the end of the treatment, the animals were anesthetized and blood was collected for serum biochemical parameters analysis. After treatment with *Bauhinia holophylla* extract, non-diabetic and diabetic rats presented no glycemic changes. On the other hand, the plant treatment decreased body weight and increased ALT and AST activities. In conclusion, the treatment with aqueous extract of *B. holophylla* leaves given to diabetic rats presented no hypoglycemic effect in nondiabetic animals and no antidiabetic effect in diabetic animals with the doses studied. In addition, the diabetic animals treated with the *B. holophylla* extract showed inconvenient effects and its indiscriminate consumption requires particular carefulness.

Key words: *Bauhinia holophylla*, diabetes, lipid profile, medicinal plants, rats.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is the name given to a group of disorders with different etiologies. It is characterized by disarrangements in carbohydrates, proteins and fat metabolism caused by complete or partial insufficiency of insulin secretion and/or insulin action (ADA 2016, Reece et al. 2004).

Several drugs are used to control diabetes, however, perfect glucose control is rarely achieved

(Cooppan 2005). Moreover, plants have been used as an alternative therapy for the diabetes treatment. Many plants present hypoglycemic activity, which were demonstrated experimentally in animals and humans, but some still require further investigation (Volpato et al. 2002, Damasceno and Volpato 2008). Although several plants were tested for diabetes treatment, many of them were not evaluated, including species of the genus *Bauhinia*, popularly known as “cow’s hoof” (Lorenzi and Matos 2002). These species typically present a wide distribution

Correspondence to: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato
E-mail: gvolpato@yahoo.com

- 8- Justina, V. D., dos Passos Junior, R. R., Bressan, A. F., Tostes, R. C., Carneiro, F. S., Soares, T. S., et al., (2018). O-linked N-acetylglucosamine deposition in placental proteins varies according to maternal glycemic levels. *Life sciences*, 205, 18-25.



O-linked N-acetyl-glucosamine deposition in placental proteins varies according to maternal glycemic levels

Vanessa Dela Justina^{a,b}, Rinaldo R. dos Passos Junior^b, Alexander F. Bressan^b, Rita C. Tostes^c, Fernando S. Carneiro^c, Thaígra S. Soares^c, Gustavo T. Volpato^b, Victor Vitorino Lima^b, Sebastian San Martín^d, Fernanda R. Giachini^{a,b,e}

^a Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, Roraima do Gargão, MT, Brazil

^c Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine of Ribeirão, São Paulo, SP, Brazil

^e Biomedical Research Center School of Medicine, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

O-GlcNAc

Hyperglycemia

Placental dysfunction

ABSTRACT

Aims: Hyperglycemia increases glycosylation with O-linked N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) contributing to placental dysfunction and fetal growth impairment. Our aim was to determine how O-GlcNAc levels are affected by hyperglycemia and the O-GlcNAc distribution in different placental regions.

Main methods: Female Wistar rats were divided into the following groups: severe hyperglycemia (> 300 mg/dL, n = 5); mild hyperglycemia (> 140 mg/dL, at least than two time points during oral glucose tolerance test; n = 7) or normoglycemia (< 120 mg/dL, n = 5). At 21 days of pregnancy, placental tissue was collected and processed for morphometry and immunohistochemistry analysis, or properly stored at -80 °C for protein quantification by western blot.

Key findings: Placental index was increased only in severe hyperglycemic rats. Morphometric analysis showed increased junctional zone and decreased labyrinth region in placentas exclusively from the severe hyperglycemic group. Protein targeted by O-GlcNAc were detected in all regions, with increased O-GlcNAc levels in the hyperglycemic group compared to control and mild hyperglycemic rats. Proteins in endothelial and trophoblast cells were the main target for O-GlcNAc. Whereas no changes in O-GlcNAc transferase (OGT) expression were detected, O-GlcNAcase (OGA) expression was reduced in placentas from the severe hyperglycemic group and augmented in placentas from the mild hyperglycemic group, compared with their respective control groups.

Significance: Placental O-GlcNAc overexpression may contribute to placental dysfunction, as indicated by the placental index. Additionally, morphometric alterations, occurring simultaneously with increased O-GlcNAc accumulation in the placental tissue may contribute to placental dysfunction during hyperglycemia.

1. Introduction

The placenta is a multifunctional and exclusively gestational organ [1] that directly regulates the transport of nutrients offered by the maternal environment across the placenta barrier [2]. This organ is a valuable tool for studying the metabolic disorders, including hyperglycemia, that occur during pregnancy, determining bad outcomes in the fetus [3].

In rodents, this organ presents three distinct regions decidua, junctional zone and labyrinth. The junctional zone is crucial for the secretion of several hormones during pregnancy, whereas the labyrinth represents the most abundant part of the placenta, where the exchange

of nutrients and gases between mother and embryo occurs. Therefore, a perfect regulation of the junctional zone and labyrinth environments are crucial for the fetal development [4,5].

The O-linked attachment of N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) to the hydroxyl group of serine (Ser) and threonine (Thr) residues of nuclear and cytoplasmic proteins is a dynamic and reversible process, altering protein function and fate and, consequently, cellular responses [6,7]. The concentration of uridine 5'-diphosphate N-acetyl-glucosamine (UDP-GlcNAc), the donor substrate for the O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins, is highly sensitive to nutrient flow, including glucose, fatty acids and amino acids [8], through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) [7,9,10]. In hyperglycemic

¹ Corresponding author at: Federal University of Mato Grosso, Institute of Biological and Health Sciences, Av. Yáldes Varjão, 6808, Roraima do Gargão, MT 78005-000, Brazil. E-mail address: fmggiachini@ufmat.br (F.R. Giachini).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.011>

Received 7 March 2018; Received in revised form 2 May 2018; Accepted 4 May 2018

Available online 07 May 2018

0024-3203/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

- 9- Soares, T. S., Andreolla, A. P., Miranda, C. A., Klöppel, E., Rodrigues, L. S., Moraes-Souza, R. Q., et al., (2018). Effect of the induction of transgenerational obesity on maternal-fetal parameters. *Systems biology in reproductive medicine*, 64(1), 51-59.

SYSTEMS BIOLOGY IN REPRODUCTIVE MEDICINE
June, VOL. 64, NO. 1, 51-59
<https://doi.org/10.1080/13653113.2017.1400865>



RESEARCH ARTICLE



Effect of the induction of transgenerational obesity on maternal-fetal parameters

Thaíra Sousa Soares , Ana Paula Andreolla^a, Carolina Abreu Miranda , Eduardo Klöppel^{a,b}, Luhara Silva Rodrigues^a, Rafailanne Queiroz Moraes-Souza^{a,b}, Débora Cristina Damasceno , Gustavo Tadeu Volpato , and Kleber Eduardo Campos

^aLaboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil; ^bGynecology, Obstetrics and Maternity Graduate Course, Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Univ Estadual Paulista_Unesp, Botucatu, São Paulo State, Brazil

ABSTRACT

Maternal obesity can cause complications for both women and their offspring for generations. Therefore, we intended to verify the repercussions of induction of transgenerational obesity on biochemical parameters, reproductive performance, and congenital anomaly frequency in Wistar rats. Female rats were used from successive generations. The female rats of parental generation (F_0 , $n=10$) were mated to obtain their offspring (F_1 generation). F_1 female rats received a monosodium glutamate (MSG) solution to induce obesity ($n=07$) or vehicle (control, $n=08$) during the neonatal period. These adult female rats were classified as normal or obese using the Lee Index, mated, and delivered offspring (F_2 generation), which were also evaluated for obesity using the Lee Index in adult life (F_2 MSG, $n=13$, born from obese dams) or non-obesity status (F_2 Control, $n=12$, born from control dams), and were mated in adulthood. During pregnancy, glycemia and an oral glucose tolerance test (OGTT) were analyzed. At term pregnancy, the females were sacrificed for serum biochemical profile, maternal reproductive outcomes, and fetal development. In F_2 MSG rats, body weight gain at early pregnancy, glycemia by OGTT, total cholesterol, high-density-lipoprotein, and alanine transaminase activity were higher compared with those of F_2 Control rats. F_2 MSG rats also presented a lower implantation number and gravid uterus weight, increased pre-implantation loss and anomaly frequency in their fetuses (F_3 generation) compared with those of F_2 Control rats. Therefore, even without significant changes in body weight gain, obesity was established at the end of pregnancy of Wistar rats using other biomarkers. Additionally, these rats showed multiple adverse reproductive outcomes, confirming the deleterious effects that lead to obesity.

ARTICLE HISTORY

Received 4 July 2017
Revised 13 November 2017
Accepted 13 November 2017

KEYWORDS

Fetus; obesity; rat; transgenerational

Introduction

Obesity and its related comorbidities have become one of the main conditions negatively impacting public health, representing an alarming global problem. The epidemic proportions of obesity are mainly resulting from lifestyle changes, including increased high calorie intake and decreased physical activities [Flegal et al. 2015]. Obesity and being overweight have also increased in women of reproductive age [McDonald et al. 2010], and have increased strongly in populations with low and average incomes, especially in urban areas of developed countries [Nelsen et al. 2016]. During pregnancy, obesity can cause complications for both women and their offspring, which may result in still-birth and congenital anomalies [Begum et al. 2011]. The impaired maternal intrauterine environment may

induce critical changes in fetal growth and development, contributing to the risk of developing disease in later life [Barker 2007; Gluckman et al. 2008].

Clinical and experimental studies show that maternal obesity induced intrauterine changes may influence the fetal organism leading to metabolic adaptations and/or complications [Gluckman et al. 2008], such as glucose intolerance, obesity, and metabolic syndrome in adult life [Barker 2007; Campos et al. 2007; Desai et al. 2013]. Obese women present an increased risk of birth defects in their offspring [Støthard et al. 2009]. In experimental models, obesity is related to an abnormal biochemical profile, with obese rats presenting with increased serum triglyceride levels and glucose intolerance in their offspring [Chen et al. 2014].

CONTACT Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato gvolpato@gmail.com Laboratório Fisiológico, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFMT, Rodovia Valdon Varjão, 6190, Barra do Garças - MT.

© 2017 Taylor & Francis

Aulas ministradas:

- 1- Acondicionamento e embalagem de amostras biológicas [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 10 horas;
- 2- Armazenamento e transporte de amostras biológicas [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 10 horas;
- 3- Parasitologia [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 50 horas;
- 4- Métodos parasitológicos de diagnóstico [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 20 horas;
- 5- Hematologia clínica no biodiagnóstico [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 80 horas;
- 6- Urinálise [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 20 horas;
- 7- Anatomia e fisiologia humana [Técnico em Enfermagem, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 90 horas;
- 8- Anatomia e fisiologia humana [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 60 horas;
- 9- Fundamentos básicos de laboratório [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 50 horas;
- 10- Processo de trabalho em laboratório de biodiagnóstico [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 40 horas;
- 11- Química aplicada [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 40 horas;
- 12- Noções de Biossegurança [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 45 horas;
- 13- Técnicas de triagem e coleta de amostras [Técnico em Análises Clínicas, Escola Técnica Estadual de Barra do Garças/SECITEC/MT], 45 horas;

Elaboração de plano de curso:

- 1- Plano de Curso de Formação Inicial e Continuada (FIC) em qualidade e eficiência na coleta de sangue, Carga horária total de 90 horas, 2017;
- 2- Plano de Curso Técnico de Nível Médio em Análises Clínicas, no eixo tecnológico Ambiente e Saúde, Carga horária total de 1.440 horas, 2018.

Aprovação em processos seletivos:

- 1- Processo Seletivo Simplificado De Professores Edital nº 002/2016/SECITEC/MT;
- 2- Processo Seletivo Simplificado De Professores Edital nº 03/2018/SECITEC/MT;
- 3- Processo Seletivo Simplificado De Professores Edital nº EDITAL Nº 01/2018/UFMT/CUA/MT de 20 DE MARÇO DE 2018

Participação em Congressos nacionais e internacionais:

- 1- XX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015;
- 2- I Workshop do PPGIP, 2015.

Apresentações de Trabalho em eventos científicos:

- 1- Effect of exercise in pregnant rats with mild diabetes on the immunological system and biochemical profiles. XX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015, Porto Alegre.
- 2- Exercício físico em ratas prenhes com diabete moderado: repercussões bioquímicas e imunológicas. I Workshop do Programa de Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas, 2015, Barra do Garças.
- 3- Effects of physical exercise in reproductive outcome of pregnant rats with mild diabetes. XX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015, Porto Alegre.

Prêmios e títulos:

- 1- Menção Honrosa ao trabalho: "Exercício físico em ratas prenhes com diabetes moderado: repercussões bioquímicas e imunológicas", I Workshop do Programa de Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. 2015.
- 2- Menção honrosa ao trabalho: Repercussões imunológicas, reprodutivas e fetais da idade de prenhez de ratas., II Workshop do Programa de Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas. 2016.

Coorientações de alunos concluídas:

- 1- Larissa Lopes da Cruz. Efeito do tratamento com extrato aquoso de folhas de *Phyllanthus niruri* L. sobre o perfil bioquímico e hematológico de ratas prenhes. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina)

Participações em bancas:

- 1- Participação em banca de Verônyca Gonçalves Paula. Efeitos do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* na prenhez de ratas Wistar: Repercussões fetais. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina);
- 2- Participação em banca de comissão julgadora na I Mostra Regional de Saúde Garças-Araguaia, 2018.
- 3- Participação em banca de comissão julgadora na IV Workshop do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas, II International Workshop do PPGIP e II RIVA-TERM Extended Meeting Brazil Edition. 2018.

Divulgação do conhecimento para leigos:

- 1- Curso teórico-prático de Tipagem Sanguínea na VII Mostra de Ciência, Tecnologia e Inovação nos dias 27 e 28 de setembro de 2018.

- 2- Palestra sobre Coleta de Sangue e Esfregaço Sanguíneo no Curso de Extensão – FisioTox (Tópicos teórico-prático de fisiologia de sistemas e toxicologia reprodutiva) no dia 22 de fevereiro de 2019.
- 3- Palestra sobre Origem e Diagnóstico da Síndrome de Down no Dia Internacional da Síndrome de Down no dia 21 de março de 2019.

Organização de eventos:

- 1- VII Mostra Local de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2017;
- 2- I Mostra Regional de Saúde Garças-Araguaia, 2018;
- 3- VIII Mostra Local de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2018.

Capítulo 2

ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SOB INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA INTRAUTERO E DA DIETA HIPERLIPÍDICA NO PERÍODO PÓS- NATAL

Thaigra de Sousa Soares^{1,2}, Yuri Karen Sinzato¹, Verônyca Gonçalves Paula¹,
Rafaianne Queiroz Moraes Souza^{1,2}, Gustavo Tadeu Volpato², Débora Cristina
Damasceno^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia e 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 dos Sistemas e Toxicologia Reprodutiva, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Estado do Mato Grosso, 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
Telefone: 55 14 38801631
CEP: 18.618-970 Botucatu,
Estado de São Paulo, Brasil
Email: debora.damasceno@unesp.br

Este artigo foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista *Life Sciences* (Fator de impacto = 3,23 – Qualis A2), para a qual será submetido.

RESUMO

Objetivos: Avaliar as alterações bioquímicas geradas pela programação fetal frente ao diabetes intrauterino materno e/ou pela dieta hiperlipídica (DHL) oferecida a filhas de ratas diabéticas.

Principais métodos: Ratas Sprague-Dawley receberam *Streptozotocin* ou tampão citrato no 5º dia de vida e foram submetidos a um teste oral de tolerância à glicose na idade adulta para avaliação do nível glicêmico como critério de inclusão e exclusão. Posteriormente, foram acasaladas para obtenção da prole que, após o desmame, as fêmeas receberam dieta hiperlipídica ou padrão de acordo com o grupo experimental. Aos 120 dias, as ratas foram anestasiadas e mortas para coleta de sangue para determinação das concentrações de colesterol total (CHO), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), triglicérides (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e avaliação dos marcadores de estresse oxidativo [níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), grupos tióis (SH), e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px), e catalase (CAT)].

Principais achados: Os animais advindos de um ambiente intrauterino desfavorável apresentaram redução nos níveis de TBARS, H_2O_2 , GSH-Px, ALT, AST, TG, CHO e VLDL e aumento de SOD. Além disso, os animais que receberam a DHL tiveram diminuição da atividade de GSH-Px e CAT e maior no nível de SOD.

Significado: Portanto, a programação fetal causada pela hiperglicemia materna foi determinante para levar a alterações no perfil bioquímico e estado redox de filhas adultas de ratas diabéticas, independentemente do tipo de alimentação a qual foram submetidas desde o desmame até a vida adulta.

Palavras-chave: programação fetal, diabetes, estresse oxidativo, bioquímica, ratos.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm evidenciado que um ambiente intrauterino inadequado é considerado fator de risco para doenças cardiovasculares, diabetes e síndrome metabólica na vida adulta [1-5], os quais reforçam a teoria proposta por Barker. Esta teoria prevê que fatores ambientais atuam no período fetal podendo levar a doenças na vida adulta destes indivíduos (*Fetal Origin of Adult Diseases* - FOAD) [6]. O conceito da teoria de Barker foi expandido para *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), pois não se restringe apenas ao período fetal e nem só ao aparecimento de doenças, mas compreende também o estado da saúde e abrange outros períodos como a concepção, período embriofetal, período de amamentação e primeira infância do indivíduo exposto [7-11].

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation* – IDF), em 2017, 451 milhões de adultos eram portadores de diabetes e estima-se que estes números devam aumentar para 693 milhões em 2045 [12]. Além disso, 21,3 milhões de nascidos vivos em 2017 foram afetados pela hiperglicemia durante a gestação [12]. Frente à importância dessa síndrome, há necessidade do desenvolvimento de novas estratégias preventivas e entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos [13]. A pesquisa em gestações humanas é complicada por restrições éticas porque envolve o bem estar da mãe e do feto, o que torna os modelos animais essenciais, não apenas por razões éticas, mas também por sua vantagem de ciclos de vida mais curtos, que são benéficos quando se estudam os efeitos transgeracionais [14, 15].

A hiperglicemia intrauterina pode transmitir o fenótipo diabetogênico para a próxima geração [16-18]. Portanto, a programação intrauterina está mais relacionada à presença da hiperglicemia materna do que ao tipo de diabetes [19-21]. Modelos animais que utilizam *Streptozotocin* (STZ) são usados para estudar tanto o *Diabetes mellitus* (DM) tipo 1 quanto o DM tipo 2 [22]. Esta droga causa destruição das células β -pancreáticas e, conseqüentemente, deficiência na síntese de insulina, levando à hiperglicemia [23, 24]. Quando STZ foi utilizado para

induzir diabetes em ratos em associação à dieta rica em gordura (DHL), foram verificadas alterações metabólicas semelhantes às do diabetes humano [25-28]. Outro estudo mostrou que, ratas que receberam STZ durante a prenhez e seus descendentes foram submetidos à DHL, estes apresentaram diminuição da tolerância à glicose independente do período de administração de DHL [29]. Quando ratas receberam DHL do 16º dia de prenhez até o fim da lactação e sua prole recebeu STZ após o nascimento e DHL durante toda a vida, foi observado aumento nas concentrações séricas de glicose e na atividade de alanina aminotransferase (ALT) [30]. Ratas que receberam DHL 28 dias antes da prenhez até o parto e que foram injetadas com STZ durante a prenhez apresentaram recém-nascidos com alterações no metabolismo e disfunção mitocondrial em cardiomiócitos e com aumento na concentração de malondialdeído (MDA) [31].

Apesar do aumento crescente de mulheres com diabetes e filhos que consomem alimentos hipercalóricos, não há estudos que relacionem as alterações bioquímicas séricas com a influência da hiperglicemia intraútero associada ou não com a dieta hiperlipídica após o nascimento. A hipótese deste estudo é que a dieta hiperlipídica oferecida a filhas de ratas diabéticas causa alterações bioquímicas mais pronunciadas quando comparadas à programação fetal gerada pelo diabetes materno. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar as alterações bioquímicas causadas pela programação fetal e dieta hiperlipídica oferecida a filhas de ratas diabéticas.

MATERIAIS E MÉTODO

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Sprague-Dawley mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h). Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum*. A Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu aprovou todos os procedimentos adotados neste estudo (Protocolo Número: 1218/2017).

Sequência experimental

A sequência experimental do experimento está resumida na Figura 1.

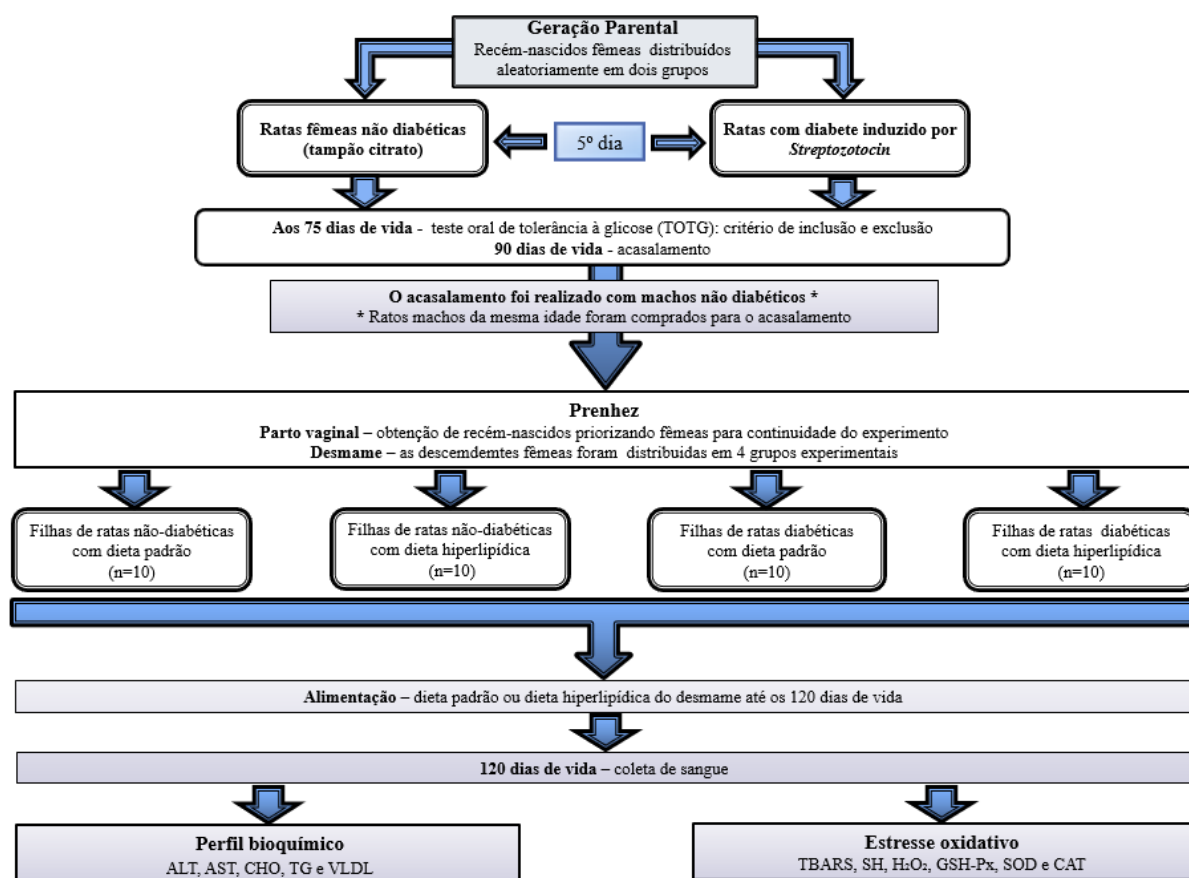


Figura 1. Sequência experimental.

Indução e confirmação do diabetes moderado

A indução do diabetes moderado (Dmod) foi realizada com uso de droga β -citotóxica, Streptozotocin (STZ - Sigma Aldrich[®], EUA), na dose de 70 mg/kg via subcutânea no 5º dia de vida pós-natal [32]. As fêmeas do grupo não-diabético (controle) receberam volume do veículo (tampão citrato - 0,01M, pH 4,5) correspondente ao do grupo que recebeu a droga diabetogênica no mesmo dia. Aos 75 dias de vida das ratas, o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) foi realizado para inclusão ou exclusão das ratas nos grupos Dmod e Controle [33]. Para isso, as ratas permaneceram seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue da cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0) usando glicosímetro convencional. Em seguida, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo e decorridos 30, 60 e 120 minutos as glicemias foram determinadas.

Crítérios de inclusão e exclusão

Para o grupo não-diabético (controle), foram incluídas apenas as ratas com glicemia de jejum <100mg/dL e inferiores a 140 mg/dL nos demais pontos do TOTG. Os animais desse grupo que apresentaram TOTG alterado foram anestesiados e mortos. Para o grupo diabético, as ratas que apresentaram TOTG alterado (glicemia de jejum <200mg/dL e pelo menos um ponto do teste com glicemia ≥ 200 mg/dL após a sobrecarga) na vida adulta foram incluídas no grupo. Os animais que não apresentaram TOTG alterado também foram excluídos e mortos.

Período de acasalamento, prenhez e lactação

Na idade adulta, as ratas diabéticas e do grupo controle foram acasaladas por no máximo durante 15 dias (correspondente a pelo menos três ciclos estrais). As ratas foram distribuídas três a três em gaiolas na presença de um rato macho durante a noite. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os esfregaços vaginais colhidos pela introdução de haste com algodão embebido em água destilada. Após análise microscópica do material depositado nas lâminas, a presença de espermatozoides confirmaram a prenhez, sendo este considerado o

dia zero. A prole foi obtida através de parto vaginal e, após o nascimento, somente os recém-nascidos fêmeas foram mantidos (máximo de oito filhotes por mãe) até o período de desmame (22º dia de vida). Nos casos em que houve mais de oito fêmeas, as excedentes foram mortas e, quando o número de fêmeas foi inferior, essas foram mantidas. Após o desmame, esses animais foram distribuídos nos grupos experimentais.

Sequência experimental dos descendentes oriundos de mães diabéticas e não-diabéticas

Cálculo do tamanho amostral

Considerando os 4 grupos experimentais e, baseado nos experimentos anteriores realizados em nosso laboratório com poder de 90% e confiabilidade de 95%, o tamanho amostral foi de 10 ratas por grupo.

Grupos Experimentais

Logo após o desmame, as ratas foram pseudorandomizadas (mínimo de 4 recém-nascidas fêmeas por mãe, sendo que 2 irmãs podiam ficar no mesmo grupo) e os quatro grupos experimentais foram assim constituídos:

- FCont DP: Filhas de ratas controle que receberam dieta padrão;
- FCont DHL: Filhas de ratas controle que receberam dieta hiperlipídica;
- FDmod DP: Filhas de ratas diabéticas que receberam dieta padrão;
- FDmod DHL: Filhas de ratas diabéticas que receberam dieta hiperlipídica.

Dieta padrão ou hiperlipídica

As filhas de ratas Controle e Dmod receberam dieta padrão (ração comercial) ou dieta hiperlipídica (Tabela 1) de acordo com o grupo experimental desde o desmame até a vida adulta (120 dias). A dieta hiperlipídica foi preparada seguindo protocolo adaptado de Francisqueti [34] na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu. A adaptação realizada foi com relação à ração comercial oferecida ao grupo controle porque Francisqueti [34] produziu uma ração padrão que continha dextrose, amido e grande quantidade de fibra.

Após o preparo da ração, a mesma foi mantida sob refrigeração até o momento do consumo dos animais.

Tabela 1. Composição das rações utilizadas durante o experimento.

Informação	Ração	
	Padrão	Hiperlipídica
Energia Bruta (cal/g)	4,022	4,925
Umidade (%)	7,45	3,65
Matéria Seca (%)	92,55	96,35
Matéria Mineral (%)	6,66	2,84
Proteína Bruta (%)	25,76	26,77
Extrato Etéreo (%)	3,49	15,19
Fibra Bruta (%)	43,63	45,42

Obtenção das amostras de sangue

Aos 120 dias de vida, as ratas de cada grupo foram submetidas à anestesia com tiopental sódico, via intraperitoneal, seguida de decapitação e de coleta de sangue para determinação das concentrações de colesterol total (CHO), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), triglicérides (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Amostras de soro foram coletadas e utilizadas para avaliação da função hepática por meio da atividade de AST e ALT e determinação das concentrações de TG e CHO para avaliação da dislipidemia pela técnica de espectrofotometria usando kits comerciais (Wiener®, Rosário, Argentina) de acordo com as instruções do fabricante. O VLDL-colesterol foi determinado por cálculo matemático aproximado proposto por Friedwald *et al.* [35].

Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

As amostras de hemácias lavadas foram utilizadas seguindo os protocolos de Yagi [36] e Buege & Aust [37] para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); Boyne & Ellman [38] modificados por Hu [39] para grupos tióis reduzidos (-SH); Noble & Gibson [40] para peróxido de hidrogênio (H₂O₂); Marklund & Marklund [41] para superóxido dismutase (SOD); método de Lawrence & Burke [42] para glutathione peroxidase (GSH-Px) e Aebi [43] para catalase (CAT).

Análise Estatística

Os resultados foram estatisticamente analisados por comparação entre as médias das variáveis dos grupos pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Para todas as comparações estatísticas, foi considerado limite mínimo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A avaliação da função hepática de filhas adultas (120 dias de vida) advindas de ambiente hiperglicêmico revelou menores atividades de ALT e AST independentemente do tipo de ração oferecida (Figura 2 - A e B).

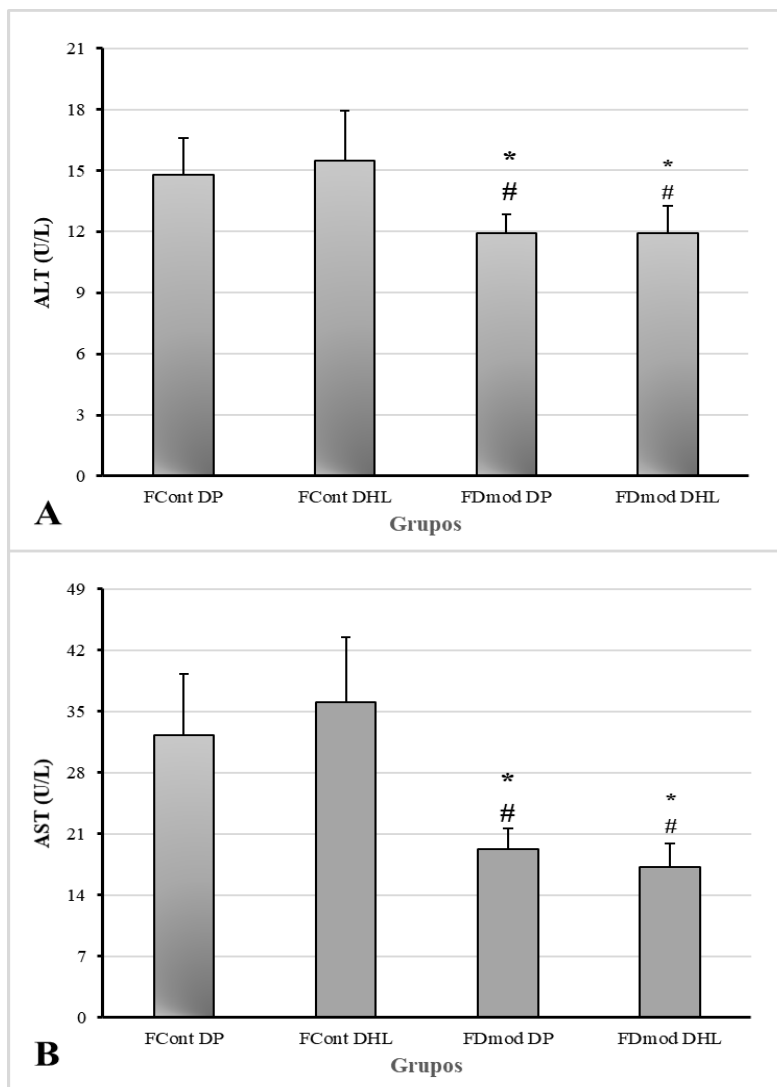


Figura 2. Média e desvio-padrão das concentrações séricas de alanina aminotransferase – ALT (A) e aspartato aminotransferase – AST (B) de ratas descendentes de mães não-diabéticas (FCont) ou diabéticas (FDmod) que receberam dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (DHL).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DHL (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

Os marcadores do perfil lipídico avaliados no 4º mês de vida foram apresentados na Figura 3. As concentrações de CHO, TG e VLDL foram menores nos grupos de animais advindos de um ambiente intrauterino hiperglicêmico, independentemente do consumo de uma alimentação hiperlipídica (Figura 3 – A, B e C).

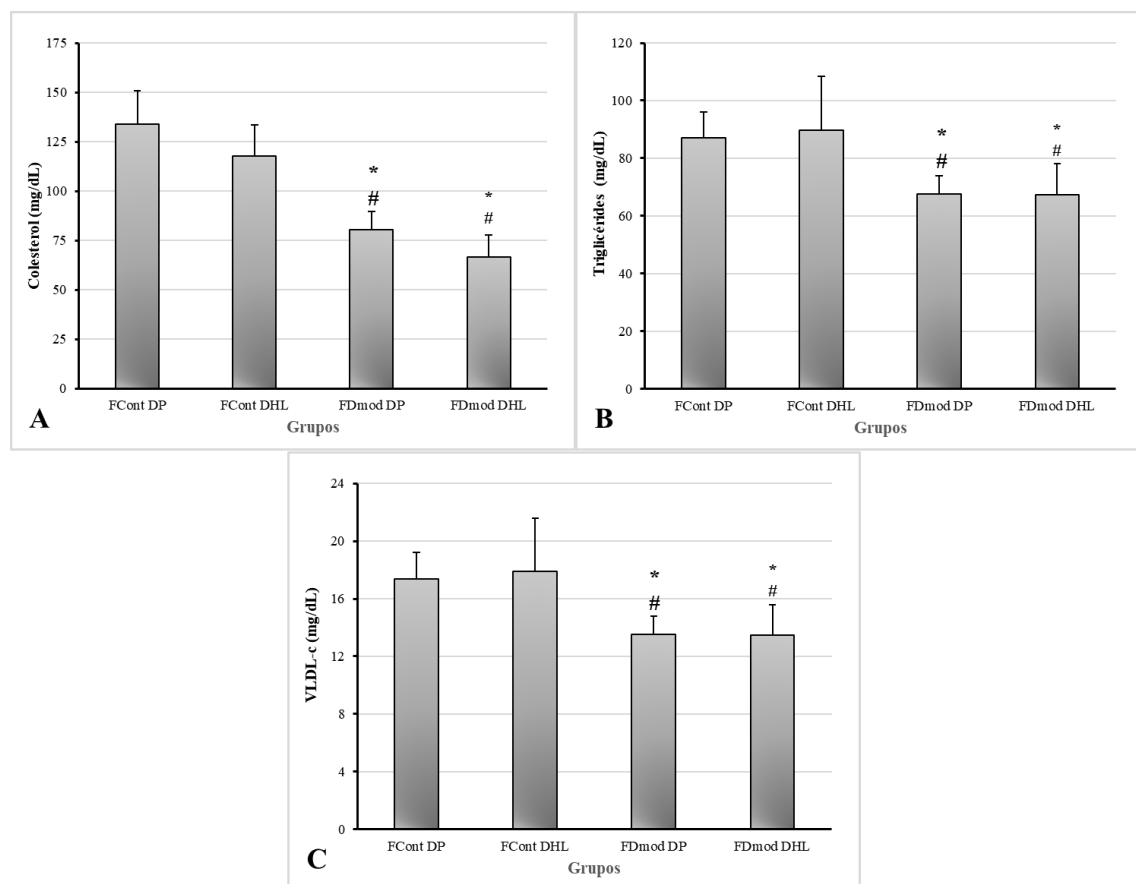


Figura 3. Média e desvio-padrão das concentrações de colesterol (A), triglicérides (B) e lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL-c (C) de ratas descendentes de mães não-diabéticas (FCont) ou diabéticas (FDmod) que receberam dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (DHL).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DHL (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

Para avaliação do estado redox, foram determinadas as concentrações de TBARS, H_2O_2 (Figura 4) e grupos tióis reduzidos (-SH) além da atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD, GSH-Px e CAT (Figura 5). Nas filhas de diabéticas, foi observada menores concentrações de TBARS e de H_2O_2 e diminuída atividade de GSH-Px, bem como aumento nas atividades de SOD e CAT independentemente da alimentação pós-natal. Além disso, as filhas de ratas controle que receberam DHL apresentaram menor atividade de GSH-Px e CAT, e aumento da atividade de SOD.

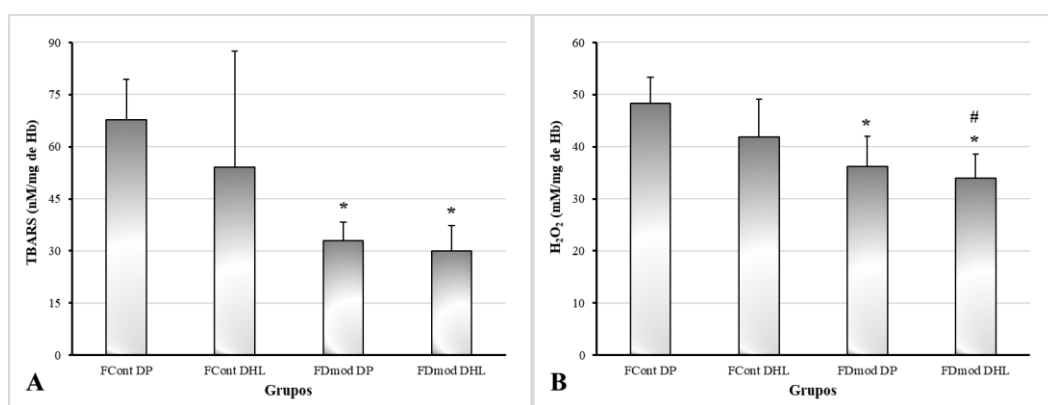


Figura 4. Média e desvio-padrão das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (B) de ratas descendentes de mães não-diabéticas (FCont) ou diabéticas (FDmod) que receberam dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (DHL).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DHL (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

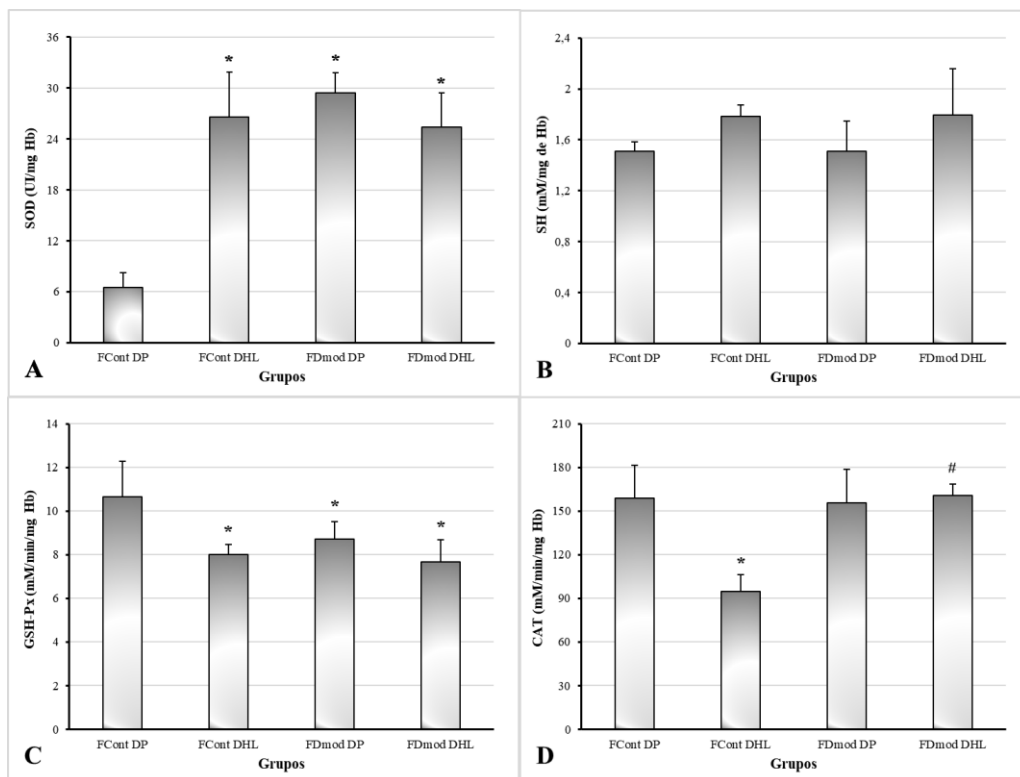


Figura 5. Média e desvio-padrão das atividades de superóxido dismutase – SOD (A), níveis de grupos tióis reduzidos – SH (B), atividades de glutathiona peroxidase – GSH-Px (C) e catalase – CAT (D) de ratas descendentes de mães não-diabéticas (FCont) ou diabéticas (FDmod) que receberam dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (DHL).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DP; # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FCont DHL (ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey).

DISCUSSÃO

A influência da exposição intrauterina materna e ambiente pós-natal, características genéticas e estilo de vida em populações humanas é de difícil reconhecimento [44]. A proposta do nosso estudo foi criar um ambiente intrauterino hiperglicêmico que, associado ao consumo de dieta hiperlipídica, permitisse avaliar as alterações no metabolismo. Diante disso, foi possível verificar que os fatores ambientais (FCont DHL), a influência do ambiente intrauterino (FDmod DP) e a união desses dois fatores (FDmod DHL) ocorreu de maneira diferente quanto aos parâmetros analisados.

A dieta é a principal fonte de compostos oxidantes [45] e, considerando que a gordura animal está associada ao estresse oxidativo no músculo esquelético, rim, fígado e tecido adiposo [46-51] e é capaz de modificar os fatores de estresse oxidativo séricos [52], era esperado esse resultado em nosso estudo. O estresse oxidativo já foi demonstrado pela redução na atividade de enzimas antioxidantes e aumento de marcadores de lipoperoxidação ou de espécies reativas do oxigênio em fêmeas que receberam DHL [53-61]. Em nosso estudo, foi observado que a DHL dada às fêmeas tinha banha de porco como fonte de gordura, que pode ter alterado o estado antioxidante ao diminuir as atividades de GSH-Px e CAT, apesar do aumento da atividade de SOD. A SOD converte o radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2), enquanto a CAT e as peroxidases convertem o H_2O_2 em água (H_2O) [62]. GSH-Px é uma selenoproteína que protege a hemoglobina contra a degradação oxidativa em células vermelhas [63]. Nossos achados sugerem que a maior atividade de SOD ocorreu para prevenir ou reparar os danos causados pelo O_2^- , enquanto a menor atividade de GSH-Px e CAT ocorreu pelo rápido consumo e exaustão dos estoques destas enzimas.

Estudos realizados em sangue de cordal umbilical de recém-nascidos de mulheres com diabetes gestacional sugerem que a tolerância normal à glicose ao nascer ocorre pela hiperinsulinemia fetal que promove maior captação de glicose [64-66]. Tem sido verificada a inibição da proliferação de células β e aumento

da morte dessas células tanto em humanos quanto em animais que são expostos à hiperglicemia [67-69]. Ratas com diabetes induzido quimicamente ao nascimento apresentaram maior número e menor área total das ilhotas pancreáticas, maior porcentagem de células marcadas para proliferação celular e menor para PDX-1 em células das ilhotas pancreáticas sendo observada intolerância à glicose na idade adulta quando submetidos à sobrecarga de glicose (TOTG) [70]. No presente estudo, foi verificado que o modelo de indução de Dmod no 5º dia de vida (STZ 70 mg/kg) nas ratas foi eficaz para reproduzir um ambiente intrauterino hiperglicêmico capaz de modificar a programação fetal ao promover redução nos níveis de TBARS, H₂O₂, GSH-Px, ALT, AST, TG, CHO e VLDL e aumento de SOD na vida adulta de seus descendentes.

A teoria do DOHaD abrange vários períodos importantes do desenvolvimento como pré-gestacional, concepção, gestação e primeira infância, nos quais as exposições específicas podem proteger ou predispor indivíduos ao desenvolvimento de doenças crônicas [71]. A partir de então, estudos clínicos randomizados [72-76] demonstraram que o controle glicêmico intensivo precoce reduzia o risco de complicações diabéticas microvasculares mas o corpo se comportava como se o ambiente glicêmico inicial pudesse ser lembrado pelos órgãos-alvo (olhos, rins, coração, membros) o que deu o nome ao fenômeno de “memória metabólica”, “memória hiperglicêmica” ou “*legacy effect*” [77, 78]. Em modelos experimentais de diabetes de intensidade glicêmica moderada (glicemia abaixo de 270 mg/dL) [79], a prole apresenta resistência à insulina, desbalanço redox (aumento da atividade de SOD, redução de GSH-Px, altos níveis de TBARS, redução da capacidade de absorção de radicais de oxigênio – ORAC) [80], aumento de triglicerídeos [80-82] e colesterol séricos [81], deposição de lipídios no fígado, pulmões e coração [83, 84], aumento do peso corporal [80, 81, 85] e hipertensão [86-88]. Há evidências de aumento na atividade de SOD em pacientes diabéticos o que sugere uma resposta adaptativa, provavelmente pelo aumento da produção de ânion superóxido, o que levaria a um aumento na produção de H₂O₂, que por sua vez, provavelmente exigiria uma maior atividade de CAT e GSH-Px [89-92]. Em nosso estudo, os descendentes

parecem ter sofrido modificação na programação fetal frente ao ambiente intrauterino hiperglicêmico. Tendo em vista que estes descendentes teriam que se defender aos oxidantes gerados pela hiperglicemia intrauterina, levou a uma memória metabólica que ainda no início da vida adulta foi capaz de responder de forma eficiente aos insultos oxidativos confirmado pela menor quantidade de H_2O_2 e TBARS e maior atividade de enzima antioxidante (SOD). Esta adaptação da memória metabólica também parece ser responsável pela menor atividade de ALT e AST [93-95], diminuição dos níveis de triglicérides, colesterol e VLDL. Entretanto, embora estas concentrações menores de TG e colesterol que o grupo controle [57, 58] possam parecer um fator de proteção, a longo prazo poderão trazer prejuízos. Triglicérides são a maior fonte de gordura do nosso organismo e a redução de seus níveis representa falta de energia ao corpo podendo gerar problemas futuros para a prole de mães diabéticas; a redução da concentração de colesterol, que é componente essencial das membranas celulares dos mamíferos, também poderá repercutir em doenças cardiovasculares e alterações hormonais. Alterações na vida adulta mais tardia já pode ser evidenciada visto que as filhas de ratas diabéticas apresentam intolerância à glicose (90%) e algumas delas já mostram-se diabéticas (10%). Enquanto que, as que se alimentaram com dieta hiperlipídica também advindas de ambiente hiperglicêmico, 60% delas eram intolerantes e 40% diabéticas, confirmando anormalidade no metabolismo de carboidrato (dados não publicados por nosso grupo de pesquisa).

A associação de um ambiente intrauterino desfavorável e consumo excessivo de lipídios (DHL) a partir do desmame gerou consequências similares às encontradas em filhos de mães diabéticas consumindo dieta adequada, mostrando que a interferência da programação fetal advinda de um ambiente intrauterino alterado foi mais significativa para a prole. Embora fosse esperada uma resposta mais evidente com a associação da vida intrauterina hiperglicêmica e consumo de uma alimentação de alta caloria, não houve esta resposta e isso pode ser explicado pela “*predictive adaptative response*” [96-98]. Trata-se de uma forma de plasticidade fenotípica frente às condições nutricionais e energéticas intrauterinas que conferem uma vantagem de sobrevivência a curto

prazo quando as condições ambientais se mantêm similares às anteriores. No entanto, com o aumento da longevidade, mudança do hábito de vida e quantidade de calorias dos alimentos e diminuição do gasto calórico, muitas doenças surgem a partir desta resposta adaptativa preditiva [96].

CONCLUSÃO

Portanto, a programação fetal causada pela hiperglicemia materna foi determinante para levar a alterações no perfil bioquímico e estado redox de filhas adultas de ratas diabéticas, independentemente do tipo de alimentação a qual foram submetidas desde o desmame até a vida adulta.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Danilo Chaguri, assistente de suporte acadêmico (ASA) da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais, ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, Escritório de Apoio à Pesquisa, pelas análises estatísticas, à FAPESP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FINANCIAMENTO

Este trabalho recebeu auxílio à pesquisa da FAPESP (Processo Número 2016/25207-5), sob coordenação da Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno, e financiamento da bolsa de Doutorado para a aluna TSSJ pela CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Elford, J., Whincup, P., & Shaper, A. G. (1991). Early life experience and adult cardiovascular disease: longitudinal and case-control studies. *International Journal of Epidemiology*, 20(4), 833-844; 10.1093/ije/20.4.833
- [2] Taylor, SJ, Whincup, PH, Cook, DG, Papacosta, O., & Walker, M. (1997). Tamanho ao nascimento e pressão arterial: estudo transversal em crianças de 8 a 11 anos. *BMJ*, 314 (7079), 475; 10.1136/bmj.314.7079.475
- [3] Huxley, R., Neil, A., & Collins, R. (2002). Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure?. *The Lancet*, 360(9334), 659-665; 10.1016/S0140-6736(02)09834-3
- [4] Gamborg, M., Byberg, L., Rasmussen, F., Andersen, P. K., Baker, J. L., Bengtsson, C., et al., (2007). Birth weight and systolic blood pressure in adolescence and adulthood: meta-regression analysis of sex-and age-specific results from 20 Nordic studies. *American journal of epidemiology*, 166(6), 634-645; 10.1093/aje/kwm042
- [5] Hemachandra, A. H., Howards, P. P., Furth, S. L., & Klebanoff, M. A. (2007). Birth weight, postnatal growth, and risk for high blood pressure at 7 years of age: results from the Collaborative Perinatal Project. *Pediatrics*, 119(6), e1264-e1270; 10.1542/peds.2005-2486
- [6] Barker, D. J. P. (1998). *Mothers, babies and health in later life*. Elsevier Health Sciences.
- [7] Bateson, P. (2001). Fetal experience and good adult design a. *International journal of epidemiology*, 30(5), 928-934; 10.1093/ije/30.5.928
- [8] Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D'udine, B., Foley, R. A., et al., (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature*, 430(6998), 419; 10.1038/nature02725
- [9] Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(4), 183-187; 10.1016/j.tem.2004.03.002
- [10] Fleming, T. P., Watkins, A. J., Velazquez, M. A., Mathers, J. C., Prentice, A. M., Stephenson, J., et al., (2018). Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *The Lancet*, 391: 1842–52; 10.1016/S0140-6736(18)30312-X
- [11] Penkler, M., Hanson, M., Biesma, R., & Müller, R. (2018). DOHaD in science and society: emergent opportunities and novel responsibilities. *Journal of developmental origins of health and disease*, 2018: 1-6; 10.1017/S2040174418000892
- [12] Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281; 10.1016/j.diabres.2018.02.023
- [13] Podell, B. K., Ackart, D. F., Richardson, M. A., DiLisio, J. E., Pulford, B.,

- & Basaraba, R. J. (2017). A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment. *Disease models & mechanisms*, dmm-025593; 10.1242/dmm.025593
- [14] Andersen, M. D., Alstrup, A. K. O., Duvald, C. S., Mikkelsen, E. F. R., Vendelbo, M. H., Ovesen, P. G., & Pedersen, M. (2018). Animal Models of Fetal Medicine and Obstetrics, Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy, Ibeh Bartholomew, IntechOpen; 10.5772/intechopen.74038
- [15] Suzuki, K. (2018). The developing world of DOHaD. *Journal of developmental origins of health and disease*, 9(3), 266-269; 10.1017/S2040174417000691
- [16] Aerts, L., & Van Assche, F. A. (2003). Intra-uterine transmission of disease. *Placenta*, 24(10), 905-911; 10.1016/S0143-4004(03)00115-2
- [17] Aerts, L., & Van Assche, F. A. (2006). Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5-6), 894-903; 10.1016/j.biocel.2005.07.006
- [18] Desai, M., Jellyman, J. K., & Ross, M. G. (2015). Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *International journal of obesity*, 39(4), 633; 10.1038/ijo.2015.13
- [19] Dabelea, D. (2007). The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes care*, 30(Supplement 2), S169-S174; 10.2337/dc07-s211
- [20] Yajnik, C. S. (2010). Fetal programming of diabetes: still so much to learn!. *Diabetes Care*, 33(5):1146–8; 10.2337/dc10-0407
- [21] Vambergue, A., & Fajardy, I. (2011). Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World journal of diabetes*, 2(11), 196-203; 10.4239 / wjd.v2.i11.196
- [22] Riehle, C., & Bauersachs, J. (2019). Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic research in cardiology*, 114(1), 2; 10.1007/s00395-018-0711-0
- [23] Rerup, C. C. (1970). Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Ver*, 22:485–518
- [24] Shafir, E. Diabetes in animals: Contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models in D. Porte, RS Sherwin and A. Baron, *Diabetes mellitus*. Diabetes mellitus. Edited by: D. Porte RSSAB. 2003, 231-255
- [25] Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological research*, 52(4), 313-320; 10.1016/j.phrs.2005.05.004
- [26] Sahin, K., Onderci, M., Tuzcu, M., Ustundag, B., Cikim, G., Ozercan, İ. H., et al., (2007). Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, 56(9), 1233-1240; 10.1016/j.metabol.2007.04.021
- [27] Albersen, M., Lin, G., Fandel, T. M., Zhang, H., Qiu, X., Lin, C. S., & Lue,

- T. F. (2011). Functional, metabolic, and morphologic characteristics of a novel rat model of type 2 diabetes-associated erectile dysfunction. *Urology*, 78(2), 476.e1-476.e8; 10.1016/j.urology.2011.03.024
- [28] Gheibi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2017). A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 605-613; 10.1016/j.biopha.2017.08.098
- [29] Blue, E. K., Ballman, K., Boyle, F., Oh, E., Kono, T., Quinney, S. K., et al., (2015). Fetal hyperglycemia and a high-fat diet contribute to aberrant glucose tolerance and hematopoiesis in adult rats. *Pediatric research*, 77(2), 316; 10.1038/pr.2014.185
- [30] Hsu, H. C., Dozen, M., Matsuno, N., Obara, H., Tanaka, R., & Enosawa, S. (2013). Experimental nonalcoholic steatohepatitis induced by neonatal streptozotocin injection and a high-fat diet in rats. *Cell medicine*, 6(1-2), 57-62; 10.3727/215517913X674252
- [31] Mdaki, K. S., Larsen, T. D., Wachal, A. L., Schimelpfenig, M. D., Weaver, L. J., Dooyema, S. D., et al., (2016). Maternal high-fat diet impairs cardiac function in offspring of diabetic pregnancy through metabolic stress and mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(6), H681-H692; 10.1152/ajpheart.00795.2015
- [32] Kiss, A. C., Lima, P. H., Sinzato, Y. K., Takaku, M., Takeno, M. A., Rudge, M. V., & Damasceno, D. C. (2009). Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 1(1), 21; 10.1186/1758-5996-1-21
- [33] Santos, T. M. M., Sinzato, Y. K., Gallego, F. Q., Iessi, I. L., Volpato, G. T., Dallaqua, B., & Damasceno, D. C. (2015). Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. *Cell Stress and Chaperones*, 20(4), 595-603; 10.1007/s12192-015-0581-4
- [34] Francisqueti, F. V., Silva, V. S., Ferron, A. J., Garcia, J. L., Santos, K. C., Ferreira, A. L., et al., (2016). Suplementação com gama- orizanol previne disfunção renal induzida por dieta rica em carboidrato. *Brazilian Journal of Nephrology*, 38: 1-3
- [35] Friedwald, W. T., Levy, R. I., & Fredrichson, D. S. (1972). Estimation of concentration of low density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem*, 18, 499-502.
- [36] Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, 15, 212-216; 10.1016/0006-2944(76)90049-1
- [37] Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic Press; 10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- [38] Boyne, A. F., & Ellman, G. L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Analytical biochemistry*, 46(2), 639-653; 10.1016/0003-2697(72)90335-1
- [39] Hu, M. L. (1994). [41] Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 380-385). Academic Press; 10.1016/S0076-6879(94)33044-1

- [40] Noble, R. W., & Gibson, Q. H. (1970). The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 245(9), 2409-2413
- [41] Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474; 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
- [42] Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952-958; 10.1016/0006-291X(76)90747-6
- [43] Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press; 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- [44] Mitanchez, D., Yzydorczyk, C., Siddeek, B., Boubred, F., Benahmed, M., & Simeoni, U. (2015). The offspring of the diabetic mother—short-and long-term implications. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 29(2), 256-269; 10.1016/j.bpobgyn.2014.08.004
- [45] Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A. P., et al., (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: problems solved?. *Redox biology*, 6, 372-385; 10.1016/j.redox.2015.08.016
- [46] Raffaella, C., Francesca, B., Italia, F., Marina, P., Giovanna, L., & Susanna, I. (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity*, 16(5), 958-964; 10.1038/oby.2008.10
- [47] Anderson, E. J., Lustig, M. E., Boyle, K. E., Woodlief, T. L., Kane, D. A., Lin, C. T., et al., (2009). Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *The Journal of clinical investigation*, 119(3), 573-581; 10.1172/JCI37048
- [48] Curtis, J. M., Grimsrud, P. A., Wright, W. S., Xu, X., Foncea, R. E., Graham, D. W., et al., (2010). Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. *diabetes*, 59(5), 1132-1142; 10.2337/db09-1105
- [49] Ruggiero, C., Ehrenshaft, M., Cleland, E., & Stadler, K. (2011). High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS production. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(6), E1047-E1058; 10.1152/ajpendo.00666.2010
- [50] Sarna, L. K., Wu, N., Wang, P., Hwang, S. Y., Siow, Y. L., & O, K. (2012). Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 90(2), 155-165; 10.1139/y11-124
- [51] Abreu, I. C. M. E. D., Guerra, J. F. D. C., Pereira, R. R., Silva, M., Lima, W. G. D., Silva, M. E., & Pedrosa, M. L. (2014). Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58(3), 251-259; 10.1590/0004-2730000002831
- [52] Yamato, M., Shiba, T., Yoshida, M., Ide, T., Seri, N., Kudou, W., et al.,

- (2007). Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *The FEBS journal*, 274(15), 3855-3863; 10.1111/j.1742-4658.2007.05914.x
- [53] Cardoso, A. R., Cabral-Costa, J. V., & Kowaltowski, A. J. (2010). Effects of a high fat diet on liver mitochondria: increased ATP-sensitive K⁺ channel activity and reactive oxygen species generation. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 42(3), 245-253; 10.1007/s10863-010-9284-9
- [54] Nadal-Casellas, A., Amengual-Cladera, E., Proenza, A. M., Lladó, I., & Gianotti, M. (2010). Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(3), 291-302; 10.1159/000320552
- [55] Emiliano, A. F., de Cavalho, L. C. R. M., Cordeiro, V. D. S. C., da Costa, C. A., de Oliveira, P. B. R., Queiroz, E. F., et al., (2011). Metabolic disorders and oxidative stress programming in offspring of rats fed a high-fat diet during lactation: effects of a vinifera grape skin (ACH09) extract. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 58(3), 319-328
- [56] Lin, Y., Han, X. F., Fang, Z. F., Che, L. Q., Nelson, J., Yan, T. H., & Wu, D. (2011). Beneficial effects of dietary fibre supplementation of a high-fat diet on fetal development in rats. *British journal of nutrition*, 106(4), 510-518; 10.1017/S0007114511000614
- [57] Torrens, C., Ethirajan, P., Bruce, K. D., Cagampang, F. R., Siow, R. C., Hanson, M. A., et al., (2012). Interaction between maternal and offspring diet to impair vascular function and oxidative balance in high fat fed male mice. *PLoS One*, 7(12), e50671; 10.1371/journal.pone.0050671
- [58] Cardoso, A. R., Kakimoto, P. A., & Kowaltowski, A. J. (2013). Diet-sensitive sources of reactive oxygen species in liver mitochondria: role of very long chain acyl-CoA dehydrogenases. *PLoS One*, 8(10), e77088; 10.1371/journal.pone.0077088
- [59] Resende, A. C., Emiliano, A. F., Cordeiro, V. S., Grazielle, F., de Cavalho, L. C., de Oliveira, P. R. B., et al., (2013). Grape skin extract protects against programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal high-fat diet during lactation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(12), 2119-2126; 10.1016/j.jnutbio.2013.08.003
- [60] Vega, C. C., Reyes-Castro, L. A., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2015). Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International Journal of Obesity*, 39(4), 712; 10.1038/ijo.2013.150
- [61] Zhou, L., Liu, D., Wang, Z., Dong, H., Xu, X., & Zhou, S. (2018). Establishment and Comparison of Juvenile Female Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology research and practice*, 2018; 10.1155/2018/8929620
- [62] Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1), 51; 10.1038/nprot.2009.197
- [63] Mills, G.C. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme that protects hemoglobin from oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 229, 189–197 (1957).

- [64] Ogata, E. S., Freinkel, N., Metzger, B. E., Phelps, R. L., Depp, R., Boehm, J. J., & Dooley, S. L. (1980). Perinatal islet function in gestational diabetes: assessment by cord plasma C-peptide and amniotic fluid insulin. *Diabetes Care*, 3(3), 425-429; 10.2337/diacare.3.3.425
- [65] Schaefer-Graf, U.M.; Graf, K.; Kulbacka, I.; Kjos, S.L.; Dudenhausen, J.; Vetter, K.; Herrera, E. Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Diabet. Care*, 2008, 31(9), 1858-1863; 10.2337/dc08-0039
- [66] Schaefer-Graf, U.M.; Meitzner, K.; Ortega-Senovilla, H.; Graf, K.; Vetter, K.; Abou-Dakn, M.; Herrera, E. Differences in the implications of maternal lipids on fetal metabolism and growth between gestational diabetes mellitus and control pregnancies. *Diabet. Med.*, 2011, 28(9), 1053-1059; 10.1111/j.1464-5491.2011.03346.x
- [67] Saito, K. E. N., Yaginuma, N., & Takahashi, T. (1979). Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 129(3), 273-283; 10.1620/tjem.129.273
- [68] Klöppel, G., Löhr, M., Habich, K., Oberholzer, M., & Heitz, P. U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Survey and synthesis of pathology research*, 4(2), 110-125; 10.1159 / 000156969
- [69] Clark, A., Wells, C. A., Buley, I. D., Cruickshank, J. K., Vanhegan, R. I., Matthews, D. R., et al., (1988). Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes research (Edinburgh, Scotland)*, 9(4), 151-159
- [70] Boloker, J., Gertz, S. J., & Simmons, R. A. (2002). Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes*, 51(5), 1499-1506; 10.2337/diabetes.51.5.1499
- [71] Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Doucette, C. A., Wicklow, B. A., & Dolinsky, V. W. (2018). Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 55(2), 71-101; 10.1080/10408363.2017.1422109
- [72] For The Diabetes, T. W. T., & Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2002). Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 287(19), 2563–2569
- [73] For The Diabetes, T. W. T., & Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2003). Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 290(16), 2159–2167; 10.1001/jama.290.16.2159

- [74] Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2003). Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 348(23), 2294-2303; 10.1056/NEJMoa022314
- [75] Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. (2005). Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 353(25), 2643-2653; 10029564796
- [76] Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R., & Neil, H. A. W. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 359(15), 1577-1589; 10.1056/NEJMoa0806470
- [77] Ceriello, A., Ihnat, M. A., & Thorpe, J. E. (2009). The “metabolic memory”: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications?. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(2), 410-415; 10.1210/jc.2008-1824
- [78] Wright, A. D. (2009). Metabolic memory in type 1 diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 9(6), 254-257; 10.1177/1474651409351645
- [79] Jawerbaum, A., & White, V. (2017). Review on intrauterine programming: consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta*, 52, 21-32; 10.1016/j.placenta.2017.02.009
- [80] Yessoufou, A., Soulaïmann, N., Merzouk, S. A., Moutairou, K., Ahissou, H., Prost, J., et al., (2006). N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *International journal of obesity*, 30(5), 739; 10.1038/sj.ijo.080321121
- [81] Soulimane-Mokhtari, N. A., Guermouche, B., Yessoufou, A., Saker, M., Moutairou, K., Hichami, A., et al., (2005). Modulation of lipid metabolism by n- 3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clinical Science*, 109(3), 287-295; 10.1042/CS20050028
- [82] Capobianco, E., Pelesson, M., Careaga, V., Fornes, D., Canosa, I., Higa, R., et al., (2015). Intrauterine programming of lipid metabolic alterations in the heart of the offspring of diabetic rats is prevented by maternal diets enriched in olive oil. *Molecular nutrition & food research*, 59(10), 1997-2007; 10.1002/mnfr.201500334
- [83] Martínez, N., White, V., Kurtz, M., Higa, R., Capobianco, E., & Jawerbaum, A. (2011). Activation of the nuclear receptor PPAR α regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 27(1), 35-46; 10.1002/dmrr.1151
- [84] Kurtz, M., Capobianco, E., Careaga, V., Martínez, N., Mazzucco, M. B., Maier, M., & Jawerbaum, A. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor ligands regulate lipid content, metabolism, and composition in fetal lungs of diabetic rats. *Journal of Endocrinology*, 220(3), 345-359;

- 10.1530/JOE-13-0362
- [85] Oliveira, A. C., Andreotti, S., Chimin, P., Sertié, R. A., da Sm Farias, T., Torres-Leal, F. L., et al., (2015). Neonatal streptozotocin-induced diabetes in mothers promotes metabolic programming of adipose tissue in male rat offspring. *Life sciences*, 136, 151-156; 10.1016/j.lfs.2015.06.024
- [86] Tain, Y. L., Lee, W. C., Hsu, C. N., Lee, W. C., Huang, L. T., Lee, C. T., & Lin, C. Y. (2013). Asymmetric dimethylarginine is associated with developmental programming of adult kidney disease and hypertension in offspring of streptozotocin-treated mothers. *PLoS One*, 8(2), e55420; 10.1371/journal.pone.0055420
- [87] Yan, J., Li, X., Su, R., Zhang, K., & Yang, H. (2014). Long-term effects of maternal diabetes on blood pressure and renal function in rat male offspring. *PLoS one*, 9(2), e88269; 10.1371/journal.pone.0088269
- [88] Vessières, E., Dib, A., Bourreau, J., Lelièvre, E., Custaud, M. A., Lelièvre-Pégorier, M., et al., (2016). Long lasting microvascular tone alteration in rat offspring exposed in utero to maternal hyperglycaemia. *PloS one*, 11(1), e0146830; 10.1371/journal.pone.0146830
- [89] Fall, C. (2009). Maternal nutrition: effects on health in the next generation. *Indian Journal of Medical Research*, 130(5), 593-599
- [90] Patel, V., Chatterji, S., Chisholm, D., Ebrahim, S., Gopalakrishna, G., Mathers, C., et al., (2011). Chronic diseases and injuries in India. *The Lancet*, 377(9763), 413-428; 10.1016/S0140-6736(10)61188-9
- [91] Ihedioha, J. I., Noel-Uneke, O. A., & Ihedioha, T. E. (2013). Reference values for the serum lipid profile of albino rats (*Rattus norvegicus*) of varied ages and sexes. *Comparative Clinical Pathology*, 22(1), 93-99; 10.1007/s00580-011-1372-7
- [92] Corvino, S. B., Volpato, G. T., Macedo, N. C. D., Sinzato, Y. K., Rudge, M. V. C., & Damasceno, D. C. (2015). Physiological and biochemical measurements before, during and after pregnancy of healthy rats. *Acta cirurgica brasileira*, 30(10), 668-674; 10.1590/S0102-865020150100000003
- [93] Chen Y. (1991). *Free radical medical*. Beijing: Beijing People's Publishing House: 83-84
- [94] Zhao, B. L. (1999). *Oxygen free radicals and natural antioxidants*. Science Publication: Beijing, 77-153
- [95] Gao, H., & Zhou, Y. W. (2005). Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(24), 3671–3674; 10.3748/wjg.v11.i24.3671
- [96] Gluckman, P. D., Hanson, M. A., & Spencer, H. G. (2005). Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends in ecology & evolution*, 20(10), 527-533; 10.1016/j.tree.2005.08.001
- [97] Nettle, D., Frankenhuys, W. E., & Rickard, I. J. (2013). The evolution of predictive adaptive responses in human life history. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1766), 20131343; 10.1098/rspb.2013.1343

- [98] Bateson, P., Gluckman, P., & Hanson, M. (2014). The biology of developmental plasticity and the predictive adaptive response hypothesis. *The Journal of physiology*, 592(11), 2357-2368; 10.1113/jphysiol.2014.271460

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/02/2012

CERTIFICADO Nº 1218/2017 -CEUA

Certificamos que a proposta intitulada: **"Avaliação de descendentes expostos ao diabetes moderado intraútero submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez"**, conduzida pela Pesquisadora Principal: **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos**, com a colaboração de Gustavo Tadeu Volpato, Antônio Carlos Lalla, Arlindo Sérgio Gabrel, Carlos Roberto Gonçalves Lima, Danilo Chaguri, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Marcos Rogério Pimentel, Ralanne Queiroz de Moraes Souza, Thaigra de Sousa Soares, Verônica Gonçalves Paula e Yuri Karen Simzato, com o nº 1218/2017, **Subprojeto I : "Análise do perfil lipídico e estresse oxidativo de ratas expostas à hiperlipidemia intraútero, dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com cálcio e vitamina D na prenhez"**, conduzido pela Pesquisadora: **Thaigra de Sousa Soares**, 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 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 27 de abril de 2017.

Inclusão do Subprojeto I – Aprovado em 12 de dezembro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29 de abril de 2019
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Sprague Dawley
Nº de animais	412
Idade/Peso	4 a 400 gramas / Recém-nascidos e adulto
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Biotério Central da Unesp - Botucatu

Graziela Nogueira Bertani
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubão Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br

ANEXO 2



unesp



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Fone: (14) 3880-1608/3880-1609
E-mail Secretaria:
ceua@fmb.unesp.br/graziela@fmb.unesp.br/sara.sampaio@fmb.unesp.br
Rua: João Buttignoli, s/nº - Distrito Rubião Junior - Botucatu/SP
CEP: 18.618-970



Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Ofício nº 016/2018-CEUA-FMB/UNESP

Botucatu, 12 de dezembro de 2018.

Prezada Senhora,

Em atendimento ao documento enviado a Comissão de Ética no Uso de Animais no dia 10 de dezembro de 2018, solicitação de inclusão de um subprojeto I ao Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEUA 1218-2017**) - **Título:** "Avaliação de descendentes expostas ao diabetes moderado intraútero submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez", conduzido pela Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos, com a colaboração de Gustavo Tadeu Volpato, Antônio Carlos Lalla, Arlindo Sérgio Gabriel, Carlos Roberto Gonçalves Lima, Danilo Chaguri, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Marcos Rogério Pimentel, Raianne Queiroz de Moraes Souza, Thaíra de Sousa Soares, Verônica Gonçalves Paula e Yuri Karen Sinzato, aprovado em 27/04/2017, informo que a inclusão solicitada foi **AUTORIZADA**, ficando na seguinte conformidade:

Subprojeto I

Título: "Análise do perfil lipídico e estresse oxidativo de ratas expostas à hiperglicemia intraútero, dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com cálcio e vitamina D na prenhez"

Aluno: Thaíra de Souza Soares Jardim

Orientador: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos

Ao final da execução do projeto é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

Ilustríssimo Senhora
Professora Doutora Débora Cristina Damasceno
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

ANEXO 3



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



Botucatu, 22 de abril de 2019.

Ilmo. Sr.
Prof. Associado Guilherme Antônio Moreira de Barros
DD. Presidente da Comissão de Experimentação no Uso de Animais (CEUA)
Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Prezado Presidente,

Gostaria de solicitar de V. Sa. e dos demais membros desta CEUA alteração do título do projeto "Avaliação de descendentes expostas ao diabetes moderado intrauterino, submetidas à dieta hiperlipídica no período pós-natal e tratadas com mistura de cálcio e vitamina D durante a prenhez", sob responsabilidade de minha aluna de pós-graduação Thaígra de Souza Soares Jardim (Nível: Doutorado), para **"ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATAS EXPOSTAS À HIPERGLICEMIA MATERNA INTRAUTERINA E SUBMETIDAS À DIETA HIPERLIPÍDICA APÓS O DESMAME."** Esta solicitação se deve ao fato de que os membros da banca sugeriram adequação do título frente aos resultados obtidos e a tese corrigida final deverá ser encaminhada à Seção de Pós-graduação com carta de aprovação de alteração do título emitida pela CEUA.

Este projeto teve isenção de já teve aprovação da referida CEUA (Ofício 016/2018) e conta com a minha participação como Orientadora, do Prof. Associado Gustavo Tadeu Volpato (Universidade Federal do Mato Grosso) como Coorientador e Yuri K Sinzato como colaboradora.

Certa de contar com sua colaboração, agradeço desde já a atenção dispensada.



Prof. Dra. Débora C Damasceno M Santos
Orientadora

ANEXO 4

Track your recent Co-Authored submission to LFS

LS

Life Sciences <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Sex, 17/05/2019 11:28

Você

↶

↷

→

...

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Thaigra Soares,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Life Sciences
 Title: Analysis of biochemical parameters under the influence of intrauterine hyperglycemia and the hyperlipidic diet in the postnatal period
 Corresponding Author: Gustavo Volpato
 Co-Authors: Thaigra S Soares, Ph.D.; Yuri K Sinzato, Ph.D.; Veronyca G Paula, Graduate student; Rafaianne Q Moraes-Souza, Ph.D.; Debora C Damasceno, Ph.D.

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/lfs/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Thaigra&lname=Soares&email=thaigrasousasoares@hotmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/lfs/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=thaigrasousasoares@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at gtvlpato@yahoo.com.

Thank you,

Life Sciences