



**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE: OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO
LABORATORIAL E AVALIAÇÃO EM RECÉM-NASCIDOS DE
MÃES COM RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO
EXERCITADAS DURANTE A PRENHEZ**

ALINE DE OLIVEIRA NETTO

Botucatu
2013

ALINE DE OLIVEIRA NETTO

**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE: OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO
LABORATORIAL E AVALIAÇÃO EM RECÉM-NASCIDOS DE
MÃES COM RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO
EXERCITADAS DURANTE A PRENHEZ**

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

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu
2013

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

Netto, Aline de Oliveira.

Análise de genotoxicidade: otimização de método laboratorial e avaliação em recém-nascidos de mães com restrição de crescimento intrauterino exercitadas durante a prenhez. / Aline de Oliveira Netto. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Capes: 40101150

1. Toxicologia genética. 2. Útero - Crescimento. 3. Natação. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Exercício (natação), Genotoxicidade, Rata, Restrição de crescimento intrauterino.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Dedicatória

A **Deus** pelo dom da vida. Por estar comigo em todos os momentos e não me deixar desistir quando já achava que não conseguiria. Por estar ao meu lado, me dar força para superar as dificuldades, e me permitir a graça de poder estudar.

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte,
não temerei mal algum porque tu estás comigo,
a tua vara e o teu cajado me consolam”
(Salmos 23:4)

Aos meus pais, **Antônio Roberto Netto e Magali Ap. de Oliveira Netto**. Sou eternamente grata por toda a dedicação, por todo esforço realizado para minha educação, pelas lições de vida, coragem, dignidade, honestidade e fé. Sempre ao meu lado, me apoiando e dando forças para não desistir. Agradeço a Deus por me permitir mais um dia de vida ao lado de vocês.

Amo vocês!

“Enquanto houver você do outro lado,
aqui do outro eu consigo me orientar....Só enquanto eu
respirar, vou me lembrar de você,
só enquanto eu respirar”
(Fernando Anitelli)

A minha irmã querida **Talita de Oliveira Netto** por tudo que vivemos juntas, o carinho, a cumplicidade e o amor partilhado. Aprendemos muito juntas e que Deus permita nossa união sempre. Obrigada por existir na minha vida, minha jóia rara.

Amo você!

“Entender o verdadeiro sentido das coisas, é querer saber demais, querer saber demais...”
(O Teatro Mágico)

Agradecimientos

A Profa. Dra. **Déborá Cristina Damasceno**, que não tenho palavras para expressar o quanto sou grata por todos seus ensinamentos e toda sua dedicação. Tenho como orientadora e amiga, agradeço a Deus por ter colocado em minha vida uma pessoa tão maravilhosa, que às vezes parece que não existe. Exemplo de professora, mãe e esposa, se eu for metade do que você é, serei muito feliz. Sem você eu não conseguiria, obrigada pelas lições de vida, no campo profissional e pessoal, sempre disposta e encantando na arte de ensinar.

Muito Obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”
(Cora Carolina)

Ao meu namorado **Wilson Roberto Alves** por estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e não me deixando desanimar. Meu amor, amigo e companheiro, que Deus continue abençoando nosso relacionamento, sou profundamente grata por existir na minha vida!

Amo você!

“Queria saber voar
Pra lá do alto poder ver você
Te ver sorrir, te ver sonhar
Coisas lindas quero te dizer
se um anjo encontrar
Eu vou pedir pra ele te proteger
Ó estrela que me faz enxergar
Que a vida é linda de viver”

(Chimarruts)

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetria: **Aline Bueno, Bruna Dallaqua, Edlaine Cristina de Lego, Daniele Pereira dos Santos, Felipe Hiroshi Saito, Fernanda Piculo, Franciane Quintanilha Gallego, Gabriela Marini, Glilciane Morceli, Gustavo Tadeu Volpato, Isabela L. Iessi, Joice Monaliza Vernini, Kleber Eduardo Campos, Mikaela da Silva Correa, Rafael Gelaleti, Rebeca Germano Serrano, Thais Tiemi Sato e Yuri Karen Sinzato**, pela alegre convivência e ajuda durante os dois anos de mestrado que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À **Silvana Barroso Corvino**, primeiramente pela linda amizade, momentos inesquecíveis, companhia para todas as horas. Exemplo de mulher guerreira e que tenho muito orgulho de ser amiga. Obrigada por me permitir entrar em sua vida e dividi-la comigo, por me ouvir, me apoiar e não me deixar desanimar.

À **Bruna Dallaqua** pela amizade e ensinamentos, que sempre soube me ouvir, me incentivando e ajudando a persistir até o final também pelo maravilhoso convívio durante essa jornada.

À **Isabela L. Iessi** pela amizade e divisão de conhecimentos, pela ajuda nos procedimentos práticos no decorrer do trabalho e pela amável convivência nesses anos.

À **Franciane Quintanilha Gallego** por toda força nesse caminho do mestrado e amizade que ultrapassa o local de trabalho. Sempre disposta a me ouvir e apoiar.

À **Lígia Maria Kfour**i amiga de todas as horas, me apoiando nessa jornada e mesmo com distância física unidas em pensamento.

Aos professores **Dr. Kleber Eduardo de Campos** e **Dr. Gustavo Tadeu Volpato**, pela ajuda e contribuição nas discussões durante esses anos.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia** e **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** pela acolhida e concessão das dependências e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)** em função do espaço físico e utilização de aparelhos durante a realização deste trabalho.

Aos **funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**, Aparecida Benedita Vasques, César Eduardo Guimarães, Regina Célia Gamito e, em especial à Ana Cláudia Garcia Mira (secretária do programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) pela dedicação e auxílios prestados.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação** Janete Aparecida Nunes Silva, Márcia F. Quadros, Regina C. Spadin, Lilian

Cristina Nunes e Andréia Longo Devides pela dedicação e serviços prestados.

Aos **funcionários da Biblioteca da Unesp de Botucatu** pela atenção durante o período do mestrado, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Ao **Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP)** da Faculdade de Medicina de Botucatu e, em especial ao bioestatístico **José Eduardo Corrente**, pela assistência nas análises estatísticas e por toda contribuição prestada.

À **Talísia Collachiti Moreto**, técnica responsável pelo Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia, pela colaboração nas rotinas laboratoriais e manutenção dos animais.

À **Capes** pela bolsa que permitiu que eu me dedicasse integralmente à minha pesquisa ao longo de todo o mestrado.

Aos **animais** que doaram suas vidas em prol da ciência.

Índice

CAPÍTULO 1 - Efeito do diabete na gestação sobre os danos no DNA: atualização de literatura

Artigo de atualização..... 15

CAPÍTULO 2 - Diferentes metodologias de descongelamento das amostras de sangue total de ratos para análise de genotoxicidade

Resumo..... 30
Introdução..... 31
Materiais e Método..... 32
Resultados..... 36
Discussão..... 36
Conclusão..... 39
Referências..... 39

Anexos..... 42

CAPÍTULO 3 - Avaliação da genotoxicidade nos descendentes de ratas que nasceram com restrição de crescimento intrauterino exercitadas durante a prenhez

Resumo.....	45
Introdução.....	46
Materiais e Método.....	48
Resultados.....	55
Discussão.....	60
Conclusão.....	61
Referências.....	62
Anexos.....	66

Capítulo 1

**EFEITO DO DIABETE NA GESTAÇÃO SOBRE OS DANOS NO DNA:
ATUALIZAÇÃO DE LITERATURA**

**EFFECT OF THE DIABETES DURING PREGNANCY ON DNA DAMAGE
(GENOTOXICITY): LITERATURE UPDATE**

**EFFECTO DEL DIABETES EN EMBARAZO SOBRE LOS DAÑOS DE DNA:
ACTUALIZACIÓN DE LA LITERATURA**

ARTIGO DE REVISÃO

**ALINE OLIVEIRA NETTO¹ - SILVANA BARROSO CORVINO² - DÉBORA
CRISTINA DAMASCENO^{3*}**

1. Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Nível: Mestrado) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp
2. Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Nível: Doutorado) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp
3. Professora Assistente Doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp

*Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno - Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ Estadual Paulista- Unesp, Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP: 18603.970, Botucatu, Brasil. Telefone: (14) 38801631.

alineonetto@gmail.com; bc.silvana@gmail.com; damascenofmb@gmail.com

Título abreviado: Gravidez e danos no DNA

RESUMO

Para ampliar os conhecimentos dos efeitos do diabete na gestação e danos no DNA, foi realizada uma revisão de literatura utilizando dois conjuntos de palavras-chave: 1) *diabetes, DNA damage, pregnancy* e 2) *rat, diabetes, DNA damage, pregnancy*, no site da base de dados do *National Center of Biotechnology Information (NCBI-PUBMED)*. No primeiro conjunto, foram encontrados 28 artigos e, no segundo, 13 artigos. Destes, 11 eram iguais aos do primeiro conjunto e dois não tinham coerência com as palavras-chave. Dos 28 artigos analisados, 28,58% foram considerados adequados para a redação da revisão e 71,42% inadequados, pois tinham títulos e resumos fora de contexto. Dos adequados, 37,5% eram relacionados à pesquisa em humanos, 50% em animais de experimentação e 12,5% em humanos e animais. De forma geral, os artigos demonstraram que o diabete aumenta espécies reativas de oxigênio gerando danos em ácidos nucleicos e isto exarceba o estresse oxidativo materno, embrionário e fetal.

Palavras-chave: diabete, danos no DNA, gestação, prenhez

ABSTRACT

To contribute the knowledge of the diabetes effects during pregnancy in the DNA damage, we performed a literature review using two groups of keywords: 1) diabetes, DNA damage, pregnancy and 2) rat, diabetes, DNA damage, pregnancy, in site of the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI-PUBMED). In the first group of keywords were found 28 articles. In the second group, there were 13 articles, which 11 were equal to the first group. Then, 28 articles were analyzed. Of these articles, 28,28% were considered adequate for writing the review, while 71,42% were considered inappropriate because they presented no coherent titles and abstracts. Of these articles, 37.5% were related to human research, 50% in experimental animals and 12.5% in humans and animals. Thus, in general, the articles showed that diabetes increases the reactive oxygen species that causes nucleic acid damage and this exacerbates maternal, embryonic and fetal oxidative stress.

Keywords: diabetes, DNA damage, pregnancy

RESUMÉN

Para aumentar el conocimiento de los efectos de la diabetes durante el embarazo en los daños de ADN, fué desarrollada una revisión de la literatura con dos grupos de palabras-clave: 1) diabetes, daño de ADN, embarazo y 2) rata, diabetes, daño de ADN, embarazo, en la base de datos de Centro Nacional de Información de la Biotecnología (NCBI - PUBMED). Para el primer grupo de palabras-clave, se encontraron 28 estudios. Para el segundo grupo, se encontraron 13, dos cuales 11 eran los mismos al del primero. De los 28 artículos, 28,58% fueron considerados aptos para la revisión, mientras que 71,42% fueron considerados inadecuados porque había malos títulos y resúmenes. De ellos, 37,5% estaban relacionadas con la investigación en humanos, 50% en animales de experimentación y 12,5% en ambos. De manera general, esa revisión demostró que la diabetes aumenta las especies reactivas de oxígeno e eso genera los daños en los ácidos nucleicos.

Descriptores: diabetes, daño en ADN, embarazo

DIABETE NA GESTAÇÃO SOBRE OS DANOS NO DNA: ATUALIZAÇÃO DE LITERATURA

DM é um grupo de doenças metabólicas, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina levando à hiperglicemia (1). Há evidências que, na gestação diabética, a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou a ineficiência do sistema de defesa antioxidante induz peroxidação lipídica nas estruturas celulares (2, 3). ERO incluem radicais do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO). Estes são formados em células vivas como consequência de reações de um metabolismo normal. Em condições fisiológicas, há o balanço entre oxidantes e antioxidantes. Entretanto, quando há excesso da geração de oxidantes ou diminuição de antioxidantes, ocorre um desbalanço chamado estresse oxidativo, o qual gera danos oxidativos em ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (4). Em condições normais, as moléculas de “limpeza” conhecidas como antioxidantes convertem ERO em água para evitar superprodução dos agentes oxidantes. Existem dois tipos de antioxidantes no corpo humano: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (5). Os antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais, neutralizam as ERO excessivas e evitam que elas danifiquem as estruturas celulares. Alguns exemplos são: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GSH-Rd), que provocam a redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e álcool. Os antioxidantes não enzimáticos também são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos dietéticos (6), caracterizados pelas vitaminas e minerais (vitamina C, vitamina E, selênio, zinco, taurina, glutathione e beta-caroteno) (5,7). A literatura evidencia que a exposição aos radicais livres a partir de uma variedade de fontes leva o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa (8). Esses mecanismos envolvem: 1) mecanismos de prevenção, 2) mecanismos de reparo e 3) aumento de defesas antioxidantes (9).

A oxidação do DNA é conhecida por ser um dos tipos mais comuns de danos no DNA (10). Modificações permanentes no material genético resultantes desses danos oxidativos representam o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento humano. A discussão sobre a melhor metodologia para avaliar a oxidação do DNA ainda é polêmica. O método tradicional é a determinação de 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (ou a base de 8 oxoGua). Em meados de 1990, foi descoberto que o DNA é propenso à oxidação durante o preparo de amostras,

assim foi desenvolvida uma abordagem alternativa com outros procedimentos (10). Para estudos de toxicogenética, foi proposto o teste do cometa em função de suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim, o teste do cometa também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. É um método rápido e sensível, pode ser utilizado para detectar bases oxidadas no DNA com emprego de endonucleases de reparo como endonuclease III (Endo III) e formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg). A detecção por Fpg e Endo III revela bases de purina e pirimidina oxidadas (12, 13).

A relação entre diabetes e estresse oxidativo está fortemente evidenciada na literatura. As repercussões do estresse oxidativo, advindo ou não do quadro diabético, gera danos no DNA. Desta forma, há interesse em se estudar a associação entre diabetes na gestação e a presença de danos no DNA. Este estudo tem como objetivo apresentar uma atualização de literatura para ampliar os conhecimentos do efeito do diabetes na gestação em relação ao metabolismo oxidativo e danos no DNA.

Foi realizada uma revisão de literatura utilizando dois conjuntos de palavras-chave: 1) *diabetes and DNA damage and pregnancy* e 2) *rat and diabetes and DNA damage and pregnancy*. A pesquisa foi investigada no banco de dados do *National Center of Biotechnology Information (NCBI – PUBMED)* considerando um período de 40 anos (1982 a 2012). Foram incluídos os artigos considerados adequados com relação às palavras-chave nos títulos e/ou resumos. Caso contrário, os artigos eram excluídos da análise.

Para o primeiro conjunto de palavras-chave, foram encontrados 28 artigos, sendo o primeiro artigo publicado em 1988. Para o segundo conjunto, 13 artigos foram encontrados, sendo o primeiro publicado em 1997. Dos 13 artigos do segundo conjunto de palavras-chave, 11 deles eram os mesmos aos do primeiro conjunto e dois não tinham coerência com as palavras-chave. Desta forma, um total de 28 artigos foram analisados/lidos. No primeiro conjunto de palavras-chave, 11 artigos não tinham coerência com as palavras-chave, oito tinham títulos e resumos bons, dois tinham títulos inadequados e resumos bons, três tinham títulos bons e resumos inadequados, três

tinham títulos e resumos inadequados, um tinha título bom e sem resumo. Dos artigos considerados adequados, isto é, possuíam títulos e resumos bons para a redação da revisão, três eram relacionados à pesquisa em humanos, quatro em animais de experimentação e um em ambos.

De acordo com os artigos analisados, foi observado que no estágio inicial da gestação diabética o controle metabólico inadequado pode estar associado ao aumento nas taxas de abortos e de malformações fetais (14, 15). A administração de antioxidantes, como a vitamina E, diminui a frequência de malformações e de mortes embrionárias, denominadas como reabsorções em animais de experimentação (16, 17, 18, 19). O impacto teratogênico frente ao ambiente intrauterino hiperglicêmico depende do excesso de ERO nos embriões, os quais podem induzir quebras nos cromossomos (20). ERO também pode reagir com as bases do DNA e alterar sua estrutura (21, 22), levando a mutações (21, 22, 23). Lee *et al.* (24) também demonstraram aumento na taxa de mutações em embriões de ratas diabéticas, que contribuíram para o aparecimento de malformações. Viana *et al.* (25) observaram que ratas prenhes diabéticas que receberam vitamina E apresentaram diminuição na taxa de embriões malformados e de reabsorções. O mecanismo pelo qual a vitamina E diminuiu essas repercussões pode estar relacionado à redução de bases de DNA alteradas e as concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – marcador de lipoperoxidação) no fígado materno. Este fato demonstra a relação entre a oxidação de lipídios e os danos no DNA como dois mecanismos associados à teratogênese causada pelos radicais livres induzidos pelo diabetes (25).

Os estudos indicam que os radicais livres podem ser produzidos como resultado de longos períodos de exposição à hiperglicemia, a qual é conhecida por causar glicação não enzimática de proteínas (26, 27, 28) e auto-oxidação da glicose (29). Há evidência que 8-OHdG é produzida pela oxidação do nucleosídeo desoxiguanosina e, subsequentemente, é excretada diretamente pela urina. 8-OHdG tem sido identificada como marcador de dano oxidativo no DNA (30, 31). Algumas pesquisas mostram aumento nas concentrações de 8-OHdG em indivíduos diabéticos com glicemia malcontrolada (32, 33) e outros autores afirmam que há associação positiva entre 8-OHdG na urina e hiperglicemia, intolerância à glicose e *Diabetes mellitus* tipo 2 em homens e mulheres (34, 32, 35, 33, 36). Qiu *et al.* (37) demonstraram que a concentração de 8-OHdG na urina materna também parece estar relacionada com o risco aumentado para o surgimento do *Diabetes mellitus* gestacional (DMG). Além disso, este trabalho

mostrou que a houve maior relação entre a concentração de 8-OHdG em mulheres que desenvolveram DMG.

Com relação aos estudos com animais de experimentação, ratas com diabetes grave (glicemia superior a 300 mg/dL) que foram expostas à fumaça de cigarro antes e durante toda a prenhez apresentaram ativação do sistema antioxidante como uma tentativa de diminuir alta lipoperoxidação, caracterizada pela produção exacerbada de TBARS (38). O mesmo grupo de pesquisa verificou que os níveis de danos no DNA foram elevados em ratas diabéticas expostas à fumaça de cigarro antes da prenhez e naquelas expostas antes e durante a prenhez em relação ao nível de danos de ratas não diabéticas e expostas ao ar filtrado. Além disso, o teste do cometa indicou que as ratas diabéticas expostas à fumaça de cigarro somente antes da prenhez apresentaram maior genotoxicidade comparada à de ratas expostas à fumaça antes e durante a prenhez. O mesmo artigo demonstrou que os fetos de ratas diabéticas, expostas ou não à fumaça de cigarro, apresentaram aumento na frequência de anomalias esqueléticas e viscerais. Esses descendentes também apresentaram sítios incompletos de ossificação, sugerindo restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (39), o que confirma que os fatores ambientais e genéticos são importantes contribuidores no aparecimento de embriopatias diabéticas (40).

De maneira similar ao diabetes, estudos em humanos e em animais têm demonstrado que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos com relação à exposição à fumaça de cigarro é aumento na formação de ERO, aumentando assim o estresse oxidativo embrionário e fetal (41). Vários fatores etiológicos têm sido propostos para explicar os graves danos embrionários relacionados ao diabetes, especialmente nos estágios iniciais da organogênese. As investigações confirmam cada vez mais que ERO causa prejuízos no desenvolvimento embrionário e fetal, pois as alterações metabólicas podem ser inicializadas desde o ambiente intrauterino, i.e., por condições maternas graves, tais como a hiperglicemia (42, 43).

ERO pode atacar todos os tipos de macromoléculas, incluindo proteínas, lipídios e DNA (44). O estresse oxidativo está envolvido no rompimento de membranas, peroxidação lipídica e no processo de mutagênese e carcinogênese (45). *Streptozotocin* (STZ) é usado para induzir diabetes em modelos experimentais porque causa efeitos tóxicos nas células beta pancreáticas (46, 47). Mossman *et al.* (48) demonstraram que o STZ induz quebra de fitas simples no DNA em uma linhagem específica de roedores (RINr 38) e que essas lesões podem ser reparadas em função do tempo, com reparo de

danos dentro de 24 horas depois da exposição ao STZ. Usando a mesma linhagem celular, Pettepher *et al.* (49) demonstraram que o STZ induz quebra em sítios álcil-lábeis de forma dose dependente no DNA mitocondrial e que essas lesões podem ser reparadas. Esses autores encontraram que 8 horas depois da exposição ao STZ, 55% das lesões induzidas no DNA mitocondrial são reparadas e os níveis de reparo aumentam para 70% em 24 horas. Desta forma, fica evidente que o STZ por si só não é responsável pelo aumento nos níveis de danos no DNA nos leucócitos de mães e de seus descendentes, mas o fator indutor é a hiperglicemia, a qual leva a complicações a longo prazo não somente por gerar mais ERO mas também por atenuar os mecanismos antioxidantes através da glicação de enzimas antioxidantes (50).

Lima *et al.* (51) avaliaram os danos oxidativos em amostras de linfócitos de ratas prenhes com diabete grave (DG) ou diabete moderado (DM) (glicemia entre 120 a 300 mg/dL) e nas amostras de sangue total de seus respectivos recém-nascidos. Estas amostras de sangue foram preparadas e analisadas pelo teste do cometa aplicando enzimas de reparo (Endo III e Fpg). Os autores demonstraram que as ratas com DM e seus filhotes apresentaram mais sítios sensíveis à Fpg, o qual refletiu os danos resultantes da hiperglicemia. As ratas com DG e sua prole mostraram mais danos oxidativos no DNA detectado tanto pela enzima Fpg quanto pela enzima Endo III, mostrando repercussões gerais relacionadas ao diabete. O tratamento enzimático para danos no DNA evidencia que as repercussões maternas do diabete estão associadas com lesões oxidativas no DNA materno e fetal, os quais não são observados em outro tipo de análise sem utilização de enzimas (65).

Desta forma, os artigos analisados demonstraram que o diabete aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais geram danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, exarcebando o estresse oxidativo materno, embrionário e fetal.

REFERÊNCIAS

- (1) American Diabetes Association (ADA). Summary of Revisions for the 2010 Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care*. 2010;33(1)S3.
- (2) Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122(4):369-82.
- (3) Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, *et al*. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in Diabetes mellitus. *Am J Med*. 1995; 98(5):469-75.
- (4) Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ Press; 1999.
- (5) Pierce JD, Cackler AB, Arnett MG. Why should you care about free radicals? *RN*. 2004; 67(1):38-42; quiz 43.
- (6) Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, *et al*. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005; 14:3-28.
- (7) Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003; 79(4):829-43.
- (8) Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. 1997; 6(4):39-7.
- (9) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al*. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1):44-84.
- (10) Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research*. 2009; 674(1-2):101-8.
- (11) Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005; 3:28.
- (12) Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, *et al*. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect*. 1996; 104(3):465-9.
- (13) Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*. 1993; 14(9):1733-5.

- (14) Mills JL, Knopp RH, Simpson JL, *et al.* Lack of relation of increased malformation rates in infants of diabetic mothers to glycemic control during organogenesis. *New Engl J Med.* 1988; 318(11):671-6.
- (15) Greene MF. Prevention and diagnosis of congenital anomalies in diabetic pregnancies. *Clin Perinatol.* 1993; 20(3):533-47.
- (16) Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia.* 1996; 39(9):1041-6.
- (17) Siman CM, Eriksson UJ. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes.* 1997; 46(6):1054-61.
- (18) Sivan E, Reece EA, Wu YK, *et al.* Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175 (4 Pt 1):793-9.
- (19) Eriksson UJ, Siman M. Pregnant diabetic rats fed the antioxidant biotilated hydroxytoluene show decreased occurrence of malformations in offspring. *Diabetes.* 1996; 45(11): 1497-1502.
- (20) Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1994; 16(1):99-109.
- (21) Breen AP, Murphy JA. Reaction of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(6):1033-77.
- (22) Friedberg E, Walker GC, Seide W. DNA repair and mutagenesis. Washington, DC: ASM Press; 1995.
- (23) Newcombe TG, Loeb LA. Mechanism of mutagenicity of oxidatively-modified bases. In: Aruoma OI, Halliwell B. eds. *Molecular biology of free radicals in human disease.* Saint Lucia: OICA International; 1998. 139-66.
- (24) Lee AT, Plum A, DeSimine C, *et al.* A role for DNA mutations in diabetes-associated teratogenesis in transgenic embryos. *Diabetes.* 1995; 44(1):20-4.
- (25) Viana M, Aruoma OI, Herrera E, *et al.* Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free Radic Bio Med.* 2000; 29(11):1115-21.
- (26) Tice RR, Agurell E, Anderson D, *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006; 35(3):206-21.

- (27) Autrup H, Vestergaard AB. Transplacental transfer of environmental genotoxins-polycyclic aromatic hydrocarbon-albumins in nonsmoking-women. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104(3):625–7.
- (28) Gladden BC, Zadorozhnaja TD, Chislovska N, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Hum. Exp. Toxicol.* 2000; 19(11):597-603.
- (29) Miller MS. Transplacental lung carcinogenesis: molecular mechanisms and Pathogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 198(2):95-110.
- (30) Erhola M, Toyokuni S, Okada K, *et al.* Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-20-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett.* 1997; 409(2):287-91.
- (31) Loft S, Vistisen K, Ewertz M, *et al.* Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis.* 1992; 13(12):2241-7.
- (32) Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, *et al.* Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 26(5):1507-12.
- (33) Negishi H, Ikeda K, Kuga S, *et al.* The relation of oxidative DNA damage to hypertension and other cardiovascular risk factors in Tanzania. *J Hypertens.* 2001; 19(3 Pt 2):529-33.
- (34) Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, *et al.* New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 1997; 417(1):150-2.
- (35) Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, *et al.* Probucol and atorvastatin decrease urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with diabetes and hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2006; 13(1):68-75.
- (36) Miyazaki Y, Kawano H, Yoshida T, *et al.* Pancreatic B-cell function is altered by oxidative stress induced by acute hyperglycaemia. *Diabet Med.* 2007; 24(2):154-60.
- (37) Qiu C, Hevner K, Abetew D, *et al.* Oxidative DNA damage in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: A pilot study. *Clinic. Bioche.* 2011; 44(10-11):804-8.

- (38) de Souza MS , Sinzato YK , Lima PHO *et al* . Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20(4):547-52.
- (39) Damasceno D C, Volpato GT, Sinzato YK, *et al*. Genotoxicity and Fetal Abnormality in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Exposed to Cigarette Smoke Prior to and during Pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011; 119(9):549-53.
- (40) Eriksson UJ. Congenital anomalies in diabetic pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009; 14(2): 85-93.
- (41) Ermis B, Ors R, Yildirim A, Tastekin A, *et al*. Influence of smoking on maternal and neonatal serum malondialdehyde, superoxide dismutase and glutathione peroxidase levels . *Ann Clin Lab Sci*. 2004; 34(4):405-9.
- (42) Damasceno DC, Volpato GT, Calderon IMP, *et al*. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats . *Anim Reprod Sci*. 2002; 72(3-4):235-44.
- (43) Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MVC, *et al*. Effect of Bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2008; 116(1):131-7.
- (44) Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, *et al*. Are oxidative stressactivated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003; 52(1):1-8.
- (45) Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993; 215(2):213-9.
- (46) Lewis C, Barbier AR. Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation. *Antibiot Ann*. 1959-1960; 7:247-54.
- (47) Mossman BT, Ireland CM, Filipak M, *et al*. Comparative interactions of Streptozotocin and chlorozotocin with DNA of an insulinsecreting cell line (PINr). *Diabetologia*. 1986; 29(3):186-91.
- (48) Pettepher CC, LeDoux SP, Bohr VA, *et al*. Repair of alkali-labile sites within the mitochondrialDNAof RNAr 38 cells after exposure to the nitrosourea Streptozotocin. *J Biol Chem*. 1991; 266(5):3113-7.
- (49) Xu GW, Yao QH, Weng QF, *et al*. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2004; 36(1):101-04.

- (50) Lima PH, Sinzato YK, Gelaleti RB, *et al.* Genotoxicity evaluation in severe or mild diabetic pregnancy in laboratory animals. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012; 120(5):303-7.

Capítulo 2

“DIFERENTES METODOLOGIAS DE DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE RATOS PARA ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE”

**ALINE OLIVEIRA NETTO^{1*} – RAFAEL BOTTARO GELALETI ^{2*} – REBECA GERMANO SERRANO^{3*}
- DÉBORA CRISTINA DAMASCENO^{4*#}**

4. Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Nível: Mestrado) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp
5. Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Nível: Doutorado) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp
6. Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (Nível: Iniciação Científica) da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp
7. Professora Assistente Doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp

* Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ Estadual Paulista- Unesp, Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP: 18603.970, Botucatu, Brasil. Telefone: 55 14 38801631
alineonetto@gmail.com; rafaelgelaleti@hotmail; rebecagserrano@gmail.com;
damascenofmb@gmail.com

Autor correspondente: damascenofmb@gmail.com;

Este capítulo foi redigido e será submetido à revista *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

RESUMO

O teste do cometa é um método sensível para detectar danos no DNA, é muito utilizado em linfócitos isolados de humanos. Porém, envolve experimentos longos e as amostras devem ser processadas logo após a coleta. Para otimizar o tempo de experimento e visando utilizar as amostras posteriormente, Hininger *et al.* (2004) congelaram amostras de sangue total humano e descongelaram após alguns meses para análise dos efeitos do congelamento nos danos do DNA. Seguindo este estudo, o objetivo foi utilizar o protocolo de Hininger *et al.* (2004) em animais de laboratório e testar outra técnica de descongelamento para verificar a influência nos danos de DNA (genotoxicidade). Após a colheita de sangue de ratos, as amostras foram submetidas a quatro experimentos diferentes: Experimento 1: de acordo com o protocolo de Lima *et al.* (2008) utilizando linfócitos a frescos, considerado padrão ouro na literatura para análise de genotoxicidade. Experimento 2: segundo protocolo padronizado por Hininger *et al.* (2004). Experimento 3: congelamento similar a Hininger *et al.* (2004), mas com modificações na técnica de descongelamento. Experimento 4: protocolo para processamento de sangue total a fresco como controle. As lâminas foram montadas com uma mistura de amostra e agarose de baixo ponto de fusão (LMP). A lamínula foi colocada e levada para a geladeira para solidificação da agarose. Após retirada da lamínula, as lâminas contendo as amostras foram colocadas em solução de lise *overnight*. A corrida da eletroforese foi conduzida e, depois, as lâminas foram neutralizadas. As amostras foram coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência. Os resultados mostraram que os testes 1, 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre si, quando analisados pelo teste do cometa por *score* visual ou pela análise em software (*tail intensity*). Portanto, foi concluído que os testes realizados com sangue total congelado foram viáveis, reduzindo a quantidade de sangue e do tempo de trabalho. Além disso, foi demonstrada maior eficiência e redução de custos nas práticas de laboratório. Este estudo apresenta uma nova abordagem aos trabalhos experimentais, visto que a literatura aborda tal assunto em humanos.

Palavras-chave: Teste do cometa, sangue total, ratos, congelamento, descongelamento e danos no DNA.

1. INTRODUÇÃO

Fatores externos podem influenciar a integridade do material genético (DNA) existente no núcleo das células. Quando um organismo é exposto a fatores químicos, físicos ou biológicos, a possibilidade de aparecimento de lesões nesse material genético pode aumentar. Diversos fatores podem danificar o DNA, como a luz solar, poluentes ambientais, estresse, exposição à fumaça de cigarro, espécies reativas ao oxigênio (ERO), exposição a raios X e hiperglicemia. Vários mecanismos envolvidos nos danos no DNA são especulados, mas o mecanismo preciso não está totalmente esclarecido. No entanto, os autores concluem que uma das repercussões é o aparecimento de câncer [1,2,3].

Para analisar as consequências da genotoxicidade são utilizados marcadores citogenéticos, como ensaio de aberração cromossômica, ensaio de troca entre cromátides-irmãs, teste de micronúcleo [4] e o teste do cometa [5]. Uma grande variedade de ensaios citogenéticos são usados com sucesso no monitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos e aberrações cromossômicas, porque avaliam a possibilidade de ocorrência de câncer na população [6]. O teste do cometa é um ensaio proposto para medir danos no DNA. É um método rápido, simples, sensível, confiável, razoavelmente barato [7] e é viável para detectar a influência de substâncias genotóxicas. O termo “genotóxico” está relacionado aos agentes que mudam a sequência do DNA e são considerados “tóxicos” para o gene. O teste do cometa não é utilizado para detectar mutações e sim lesões genômicas [8]. Esse método permite a detecção de várias classes de alterações no DNA como, quebra de fita simples e dupla, sítios alcali lábeis, sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas [9]. Estudos com seres humanos mostram que o ensaio do cometa é amplamente utilizado em linfócitos isolados [10], pois linfócitos proporcionam uma fonte conveniente e prontamente disponível de material humano. Além disso, são utilizados experimentalmente para avaliar os potenciais efeitos tóxicos e citoprotetores nos danos no DNA e reparo. Embora o teste do cometa utilize linfócitos isolados de humanos, cabe enfatizar que esse teste envolve experimentos longos e as amostras devem ser processadas imediatamente após a colheita do material biológico. Para otimizar o tempo de processamento e visando utilizar as amostras para análises de genotoxicidade posteriormente, Hininger *et al.* [11] congelaram amostras de sangue total humano, descongelaram após alguns meses e verificaram que o método era adequado para análise dos danos do DNA.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi utilizar o protocolo de Hininger *et al.* [11] em animais de laboratório e testar outras técnicas de descongelamento para verificar a influência

nos danos de DNA (genotoxicidade), visando ajustar o experimento mais apropriado para o armazenamento das amostras de sangue total para processamento e análises posteriores.

2. MATERIAIS E MÉTODO

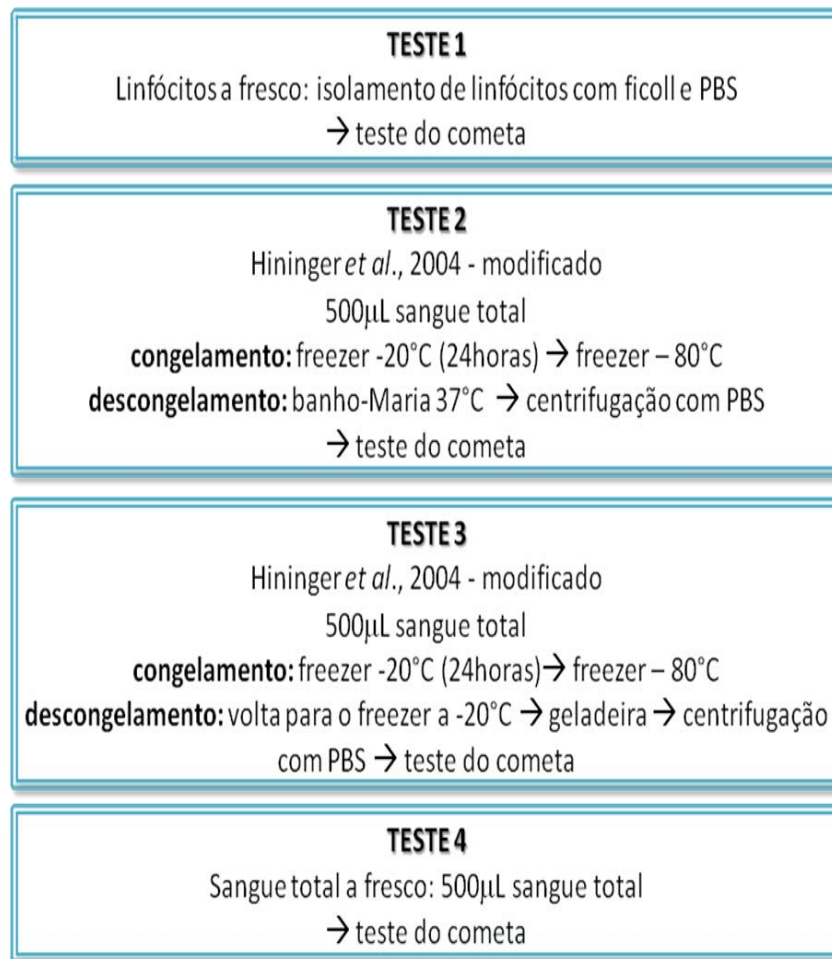
2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, na idade de três meses, pesando em torno de 250g. Os animais foram adquiridos do Centro de Investigação Biológica (CEMIB – Unicamp, Campinas, Estado de São Paulo, Brasil). Esses animais foram mantidos sob condições controladas em nosso biotério. Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp (Protocolo No. 952/2012_ANEXO 1).

2.2 Seqüência Experimental

Ratos machos adultos foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®] - 50 mg/kg) para dessangramento e colheita de amostras de sangue total em tubos a vácuo com anticoagulante (EDTA - ácido etilendiamina tetraacético). As amostras de sangue foram processadas aleatoriamente utilizando quatro diferentes testes experimentais (n=4 animais/teste) (FIGURA 1):

Figura 1. Diferentes testes de descongelamento das amostras



Experimento 1: O teste com o uso de amostras de linfócitos foi realizado pelo fato de ser considerado como padrão ouro no teste do cometa. Este experimento seguiu o protocolo de Lima *et al.* [12] para isolamento de linfócitos a fresco de ratos. Os linfócitos foram isolados com *ficoll* e submetidos à centrifugação com PBS (tampão salina fosfato). 20µl da amostra foram misturados a 120µl de agarose LMP (*Low Melting Point*) e colocados em uma lâmina contendo agarose NMP (*Normal Melting Point*) previamente preparada. As lamínulas foram colocadas sobre as lâminas e levadas para geladeira (4°C) para que a agarose se solidificasse. O procedimento foi feito em duplicata para cada amostra. Na etapa seguinte, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise contendo NaCl a 2,5 M, EDTA (100 mM), Tris (10mM), Triton X-100 (1ml), DMSO (10 mL), N-Lauroil-sarcosinato (1%) e levadas à geladeira para obtenção de nucleóides. Em seguida, as lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com PBS gelado por 5 minutos. As lâminas seguiram para corrida de eletroforese, foram neutralizadas e

coradas com brometo de etídio para análise dos nucleóides com relação à presença de danos no DNA.

Experimento 2: Foi realizado de acordo com o protocolo modificado de Hininger *et al.* [11]. O sangue foi colhido em tubos a vácuo com EDTA. Foram coletados 500µL da amostra de sangue total e armazenados em um *ependorf* contendo 400µL de meio de cultura RPMI 1640 e 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A etapa de congelamento deste estudo difere do protocolo de Hininger *et al.* [11], que armazenaram as amostras de sangue humanas em caixas de criopreservação com decaimento de temperatura até as mesmas serem transferidas para freezer a -80° C. No entanto, em nosso estudo, nossas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C por 24 horas e, em seguida, foram transferidas para freezer a -80°C onde permaneceram no máximo até quatro meses. Para o procedimento de descongelamento, as amostras foram descongeladas em banho-Maria a 37°. Nos *ependorfs*, foram visualizados *pellets*, os quais foram lavados com PBS. Similarmente ao experimento 1, as lâminas contendo a amostra foram montadas em duplicata (20µl de amostra foram misturados com 120µl agarose LMP). As amostras presentes nas lâminas foram colocadas em solução de lise, seguiram para eletroforese, neutralização e coloração para avaliação de danos no DNA.

Experimento 3: O procedimento de congelamento foi semelhante ao experimento 2, mas a etapa de descongelamento das amostras diferiu pelo fato das amostras terem sido retiradas do freezer a -80°C, levadas para freezer a -20°C e permanecerem por 24 horas. Após este tempo, as amostras foram levadas para geladeira onde permaneceram por no máximo 30 minutos. A seguir, todos os outros procedimentos para montagem das lâminas contendo as amostras foram similares aos adotados para os experimentos 1 e 2.

Experimento 4: O teste foi realizado com amostras de sangue total a fresco e este foi considerado como controle dos experimentos. O sangue foi coletado em tubo a vácuo com EDTA, foram coletados 500µL de sangue total e preparadas as lâminas com o sangue total a fresco. Todos os outros procedimentos de montagem das lâminas com as amostras foram similares aos experimentos 1, 2 e 3.

2.3 Teste do Cometa

2.3.1 Reagentes e soluções

Foram utilizados os seguintes materiais: agarose com ponto de fusão normal (*Normal Melting Point* - NMP) e agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* - LMP) (Collins *et al.*, 1998), cloreto de sódio (NaCl), brometo de etídio, dimetilsulfóxido (DMSO), etil-diaminotetracetato de sódio (EDTA), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), N-

Lauroil-sarcosinato, tampão salina fosfato (PBS) livre de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), Tris e Triton X-100.

2.3.2 Tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Foi utilizada solução de H_2O_2 (400 μM) para obtenção do controle positivo. Em seguida, as amostras de sangue total e linfócitos foram incubadas por 5 minutos no gelo seguindo protocolo descrito por Blasiak *et al.* [13] com algumas modificações com relação à molaridade da solução de H_2O_2 (10 μM).

2.3.3 Eletroforese

O teste do cometa foi realizado segundo o protocolo descrito por Tice *et al.* [14] com algumas modificações [12]. As lâminas com as amostras-testes foram colocadas na cuba de eletroforese horizontal onde foram incubadas em solução tampão de eletroforese (pH=13), composta por NaOH e EDTA, por 20 minutos a 4°C. Em seguida, foi realizada a corrida de eletroforese (25 volts, 30 minutos e 300 mA). Após eletroforese, as amostras das lâminas foram neutralizadas em Tris (pH=7,5) durante 15 minutos, fixadas em etanol a 100% e secas à temperatura ambiente.

2.3.4 Coloração

Após secagem, as amostras das lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada lâmina foi coberta por lamínula e o material foi analisado em microscópio imediatamente.

2.3.5 Análise das lâminas

As amostras das lâminas foram analisadas usando sistema de score visual, sendo consideradas cinco diferentes classes (de 0 - sem cauda a 4 – pontuação máxima de danos no DNA) (ANEXO 2). Um total de 100 nucleóides por amostra foram analisados. Para cada nucleóide analisado foi atribuído o valor de 0 a 4 de acordo com sua característica para cada lâmina contento as amostras [15]. Além da análise por score, as lâminas foram avaliadas em microscópio de fluorescência num aumento de 400x. Foram observados 100 nucleóides por amostra (50/lâmina), por sistema de análise de imagem automática (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK*). *Tail intensity* (definido como os valores de intensidade na região da cauda menos a região da cabeça, em %) foi selecionado como indicador de dano no DNA [16].

3. Análise estatística

A comparação dos valores do *score* visual, obtidos nos diferentes testes empregados

utilizando o teste do cometa, foi realizada pelo Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Para a comparação dos níveis de danos no DNA nos testes 1, 2, 3 e 4, analisada pelo *software (tail intensity)*, foi empregada a Distribuição Gama. $p < 0,05$ foi considerado como limite de significância estatístico.

4. RESULTADOS

O tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi ineficaz nos testes com sangue total congelado e a fresco.

A tabela 1 mostra que os níveis de danos no DNA entre os diferentes testes de descongelamento, por *score* visual e *tail intensity*, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 1. Níveis de danos no DNA por *score* e por análise em *software (tail intensity)* de amostras de sangue total e de linfócitos de ratos Wistar adultos.

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
Danos no DNA (<i>score</i> visual)	1,12 ± 0,93	1,16 ± 0,58	1,22 ± 0,56	1,20 ± 0,40
Danos no DNA (<i>tail intensity</i>)	33,32 ± 16,46	33,65 ± 16,20	36,78 ± 18,82	34,54 ± 17,15

Dados apresentados como média ± desvio-padrão

$p > 0,05$ – sem diferença estatisticamente significativa

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que os níveis de danos no DNA, pela análise de *score* visual ou pela análise em *software (tail intensity)*, não diferiram entre as amostras de linfócitos a fresco de ratos comparados aos outros testes empregados com a utilização de amostras de sangue total, a fresco ou congelado. Da mesma forma, Braz & Salvadori [17] compararam sangue total fresco com linfócitos isolados frescos, obtidos de amostras humanas, e não observaram diferenças nos níveis de danos no DNA. Muitos protocolos já foram desenvolvidos para extrair linfócitos a partir de amostras de sangue total congelado. Stevens *et al.* [18]

corroboram com nossos resultados porque desenvolveram e testaram um protocolo de criopreservação de amostras de sangue total sem a utilização de equipamentos especializados. Estes autores observaram que as variações de temperatura, utilizando apenas gelo e freezer, não comprometeram a coleta e a criopreservação dessas amostras de sangue.

O uso de sangue total no teste do cometa para medir danos no DNA presente nos leucócitos é mais simples e envolve menos manipulação das células, ao contrário do que ocorre quando se realiza o isolamento dos linfócitos [19]. Outros autores argumentam que os linfócitos (humanos) podem ser utilizados frescos ou criopreservados a -196°C para futuras análises [20]. Duthie *et al.* [21] concluíram que os linfócitos humanos isolados a fresco ou congelados não apresentam aumento de danos no DNA e podem ser criopreservados com sucesso.

Diferentemente dos linfócitos, poucos estudos relatam sobre o uso de amostras de sangue total como meio para otimizar o tempo nos experimentos. Hininger *et al.* [11] utilizaram amostras de sangue total humano a fresco e congelado de indivíduos fumantes e não fumantes. Após a colheita de amostras de sangue total, foi adicionado meio de cultura RPMI 1640 e DMSO. As amostras foram congeladas progressivamente e armazenadas em freezer a -80°C até quatro meses. O descongelamento foi feito em banho-Maria a 37°C e as amostras foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato). Não foi observada diferença nos níveis de danos no DNA entre as amostras de sangue total a fresco e congelado utilizando o teste do cometa. Os autores concluíram que o sangue total congelado pode ser utilizado em associação com o teste do cometa em estudos epidemiológicos para biomonitoramento de danos genéticos em populações de risco, sendo o congelamento estável até quatro meses. Al Salmani *et al.* [22] compararam amostras de sangue total humano fresco e congelado, com ou sem DMSO, e observaram que não houve diferenças nos resultados dos danos no DNA em amostras sem adição de DMSO. No entanto, esses resultados são controversos porque DMSO é utilizado como um crioprotetor.

Há necessidade de se discutir o fator tempo e os custos gerados nos ensaios de bancada para a análise de genotoxicidade visando minimizar este tempo para processamento das amostras. De acordo com nossos resultados, os testes 1, 2, 3 e 4 não mostraram diferenças com relação aos níveis de danos no DNA entre si, mostrando que as amostras de sangue total congelado não sofreram interferência do congelamento e/ou descongelamento. Além disso, cabe ressaltar que as análises de genotoxicidade, por *score* visual ou empregando o *software Comet Assay IV* para obtenção dos dados de *tail intensity*, não diferiram entre ambos.

Existe ampla discussão na literatura de que, pelo fato das células sanguíneas vermelhas e plaquetas não terem núcleos, estas células não contribuem para análise de danos

no DNA pelo teste do cometa. Narayanan *et al.* [20] verificaram influência das células sanguíneas vermelhas nas amostras de sangue total *in vitro* quanto à quebra de fitas simples de DNA em linfócitos humanos. Os danos no DNA aumentaram quando o linfócito foi analisado na presença de células vermelhas comparados aos de linfócitos isolados. Os candidatos presentes no sangue total que poderiam ser capazes de causar o dano observado seriam os neutrófilos e a lise de células sanguíneas vermelhas. Segundo Chuang & Hu [23], as células vermelhas não interferem nos valores de danos utilizando o teste do cometa. Estes autores justificam que as células vermelhas são lisadas em dois passos do teste, no momento da incubação na solução de lise e na eletroforese. Durante incubação com a lise, as membranas celulares são rompidas e, conseqüentemente, as células vermelhas sanguíneas são lisadas. Na eletroforese, o DNA é desenrolado e as células que sobram são completamente lisadas. Além disso, estes mesmos autores [23] verificaram que, após o isolamento de linfócitos e coleta de sangue total humano e de ratos, as amostras foram congeladas com meio de cultura RPMI e DMSO e armazenadas em freezer a -80°C para posterior realização do teste do cometa. Depois de 60 dias, as amostras foram descongeladas em banho-Maria a 37°C e foi realizado o teste do cometa imediatamente. Os nucleóides estavam intactos nas amostras de sangue total e nos linfócitos criopreservados com DMSO. Além disso, estes resultados foram similares aos do sangue total e de linfócitos isolados a fresco. Com relação à comparação dos níveis de danos no DNA entre as amostras de linfócitos e de sangue total humano e de ratos em função do tempo de armazenamento a 4°C, não foi verificada diferença, contradizendo Narayanan *et al.* [20], que observaram que o sangue total humano não pode ser armazenado por mais de 24 horas a 4°C.

Berchieri-Ronchi *et al.* [24] extraíram linfócitos das amostras de sangue de suínos e congelaram com soro bovino fetal, RPMI e DMSO. Para o processo de descongelamento, foi utilizado banho-Maria a 37°C e foram adicionados RPMI e soro bovino fetal. No 30º dia de prenhez (fase inicial), foi observada diminuição de danos oxidativos, mas houve aumento de danos ao longo da prenhez e na lactação devido ao aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO). Além disso, os autores demonstraram que o congelamento de linfócitos não aumentou a quebra de fitas simples no DNA quando analisado pelo teste do cometa.

Além das análises de danos no DNA, também cabe ressaltar os custos em cada teste feito em nosso estudo. Foi demonstrado que o teste 2 (protocolo de Hininger *et al.* [11] – modificado) apresenta uma nova possibilidade de coleta e armazenamento de amostras visando análises futuras, pois exclui a etapa de isolamento de linfócitos. Isto reduz os custos com reagentes e outros materiais. O teste 3 também foi considerado viável para o estudo, pois as amostras foram descongeladas utilizando equipamentos similares aos utilizados para o

congelamento. No entanto, a metodologia que utiliza sangue total a fresco e isolamento de linfócitos apresenta desvantagem do fato de serem preparados imediatamente após a coleta de sangue. Após extensa análise dos artigos que mencionam o uso de amostras de sangue total ou linfócitos, a fresco ou criopreservados, foi verificado que existem muitas diferenças nos resultados intra e interlaboratoriais quanto à análise de genotoxicidade via teste do cometa. Isto se deve a diversos fatores como, tempo de descanso no tampão de eletroforese, voltagem da cuba de eletroforese, tempo de corrida da eletroforese, concentração de agarose e quantidade de solução tampão de eletroforese, a qual pode interferir na corrente, pois a água é condutora de energia [25].

Portanto, de acordo com nossos resultados, os testes que foram realizados com sangue total congelado foram viáveis, pois reduziram a quantidade de sangue necessária quando comparada à quantidade de sangue utilizada para isolamento de linfócitos, não necessitou do processo de isolamento de linfócitos, dispensando muitas horas de técnica, o que mostrou maior eficiência e redução de custos nas práticas de laboratório. O estudo também apresenta uma nova abordagem nos trabalhos experimentais, visto que a maioria dos artigos que abordam tal assunto é realizada em humanos.

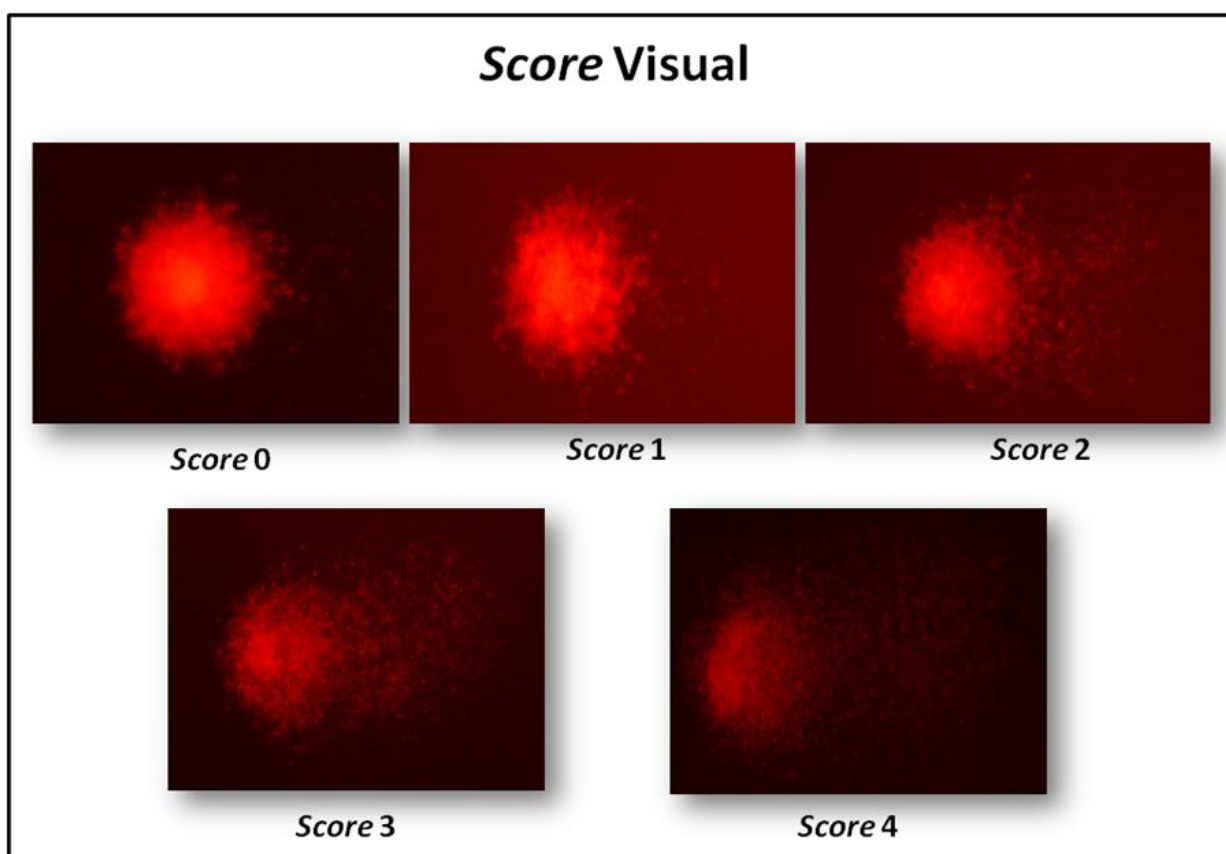
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. G.M. Halliday, J. Cadet. It's All about Position: The Basal Layer of Human epidermis Is Particularly Susceptible to Different Types of Sunlight-Induced DNA Damage, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 265-7.
2. H. Hoffmann, J. Högel, G. Speit. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis, *Mutagenesis.* 20 (2005) 455-66.
3. H. Ikehata, T. Ono. The Mechanisms of UV Mutagenesis, *J. Radiat. Res.* 52 (2011) 115–25.
4. N. Titenko-Holland, LE. Moore, MT. Smith. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutat Res.* 312 (1994) 39-50.
5. A.R. Collins, V.L. Dobson, M. Dusinska, G. Kennedy, R. Stetina. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research.* 375 (1997) 183–93.
6. W.W. Au, A.O. Badary, M.Y. Heo. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens, *Occup. Med.* 16 (2001) 345-57.

7. A.R. Collins, K. Raslová, M. Somorovská, H. Petrovská, A. Ondrusová, *et al.* DNA damage in diabetes: correlations with a clinical marker, *Free Rad. Biol. Med.* 25 (1998) 373-7.
8. L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas, In: L.R. Ribeiro, D.M. F. Salvadori, E.K. Marques (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, Canoas, 2003, pp. 274-279.
9. F. Kassie, W. Parzefall, S. Knasmüller. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 463 (2000) 13–31.
10. C. Betti, T. Davini, L. Giannesi, N. Loprieno, R. Barale. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 healthy subjects, *Mutat. Res.* 307 (1994) 323–33.
11. I. Hininger, A. Chollat-Namy, S. Sauvaigo, M. Osman, H. Faure, J. Cadet, A. Favier, A.M. Roussel. Assesment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smoker and non-smokers, *Mutat. Res.* 558 (2004) 75-80.
12. P.H.O. Lima, D.C. Damasceno, Y.K. Sinzato, M.S.S. Souza, D.M.F. Salvadori, Ide. M. Calderon, M.V. Rudge. Levels of DNA damage in blood leukocyte samples from non-diabetic and diabetic female rats and their fetuses exposed to air or cigarette smoke, *Mutat. Res.* 653 (2008) 44–9.
13. J. Blasiak, M. Arabski, R. Krupa, K. Wozniak, M. Zadrozny, J. Kasznicki, M. Zurawska, J. Drzewoski. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus, *Mutat. Res.* 554 (2004) 297-304.
14. R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-21.
15. A.R. Collins. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249-61.
16. R.P. Prado, B.F. dos Santos, C.L. Pinto, K.R. de Assis, D.M. Salvadori, M.S. Ladeira. Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis.* 25 (2010) 483-7.
17. M.G. Braz, D.M.F. Salvadori. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay, *Toxicol. In Vitro.* 21 (2007) 972-6.
18. V.L. Stevens, A.V. Patel, H.S. Feigelson, C. Rodriguez, M.J. Thun, E.E. Calle. Cryopreservation of whole blood samples collected in the field for a large epidemiologic study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 16 (2007) 2160-3.

19. L. Giovannelli, V. Pitozzi, S. Riolo, P. Dolara. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay, *Mutat. Res.* 538 (2003) 71–80.
20. S. Narayanan, M.R. O'Donovan, S.J. Duthie. Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes, *Mutagenesis.* 16 (2001) 455-9.
21. S.J. Duthie, L. Pirie, A.M. Jenkinson, S. Narayanan. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability, *Mutagenesis.* 17 (2002) 211-4.
22. K. Al-Salmani, H.H.K. Abbas, S. Schulpen, M. Karbaschi, I. Abdalla, K.J. Bowman, K.K. So, M.D. Evans, G.D. Jones, R.W. Godschalk, M.S. Cooke. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood, *Free. Rad. Biol. Med.* 51 (2011) 719–25.
23. C.H. Chuang, M.L. Hu. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay, *Mutat. Res.* 564 (2004) 75-82.
24. C.B. Berchieri-Ronchi, S.W. Kim, Y. Zhao, C.R. Correa, K.J. Yeum, A.L. Ferreira. Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation, *Animal.* 5 (2011) 1774-9.
25. A. Azqueta, K.B. Gutzkow, G. Brunborg, A.R. Collins. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutat. Res.* 724 (2011) 41-5.

ANEXO 2 - Análise por *score* visual seguindo Collins *et al.*, 2004.



Capítulo 3

“Avaliação da genotoxicidade nos descendentes de ratas que nasceram com restrição de crescimento intrauterino exercitadas durante a prenhez”

RESUMO

As condições de saúde no transcorrer da vida adulta resultam da combinação entre genótipo e fenótipo, que se inicia no período pré-natal, uma vez que o meio ambiente intrauterino influencia o desenvolvimento embrionário, sendo permanentemente modificadas em relação à fisiologia e metabolismo. A gestação é um estado inflamatório que aumenta a susceptibilidade ao desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, levando a um aumento do quadro de estresse oxidativo e danos no DNA. Visando minimizar estas complicações, muitos especialistas recomendam a prática de exercício físico. Frente a isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do exercício físico na prenhez de ratas Wistar que nasceram com restrição de crescimento intrauterino frente às possíveis alterações transgeracionais analisando níveis de danos no DNA maternos e dos recém-nascidos. Nossos resultados mostram que ratas que nasceram com peso adequado (AIP) e com peso pequeno (PIP) e foram submetidas ao exercício físico durante a prenhez ou não apresentaram ausência de alterações no teste oral de tolerância à glicose. Os níveis de danos no DNA de ratas AIP e PIP exercitadas foram menores, mas os das ratas PIP E foram maiores comparados aos das ratas AIP E. As ratas (AIP e PIP) exercitadas apresentaram porcentagem maior de recém-nascidos (RN) classificados como PIP em relação às não exercitadas. Quanto aos recém-nascidos, os níveis de danos no DNA não diferiram entre os sexos e os RN de ratas-mães PIP NE apresentaram maiores níveis de danos no DNA comparados aos de mães AIP NE. Já os RN de ratas-mães PIP E exibiram menores níveis de danos em relação aos de mães PIP NE. Portanto, nossos resultados mostraram que o exercício físico (natação) contribuiu para a estabilidade genética materna, demonstrada pela redução da genotoxicidade, mas causou comprometimento no peso dos recém-nascidos, evidenciado pela restrição de crescimento intrauterino. Também foi evidenciado que o exercício físico aplicado a ratas-mães com RCIU levou a efeito benéfico na redução dos níveis de danos no DNA de seus descendentes. Desta forma, as gestantes devem ser encorajadas a praticar exercício físico, mas devem ser supervisionadas por especialistas considerando suas limitações, o tipo e a intensidade do exercício e o momento apropriado na gestação.

Palavras-chave: ratas, genotoxicidade, danos no DNA, exercício (natação)

INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o crescimento e o desenvolvimento fetal no meio intrauterino são fortemente dependentes dos nutrientes oferecidos pela mãe, aumentando nesse período as necessidades maternas de carboidratos, proteínas e lipídeos (Rudge *et al.*, 2000; Aerts & Van Assche, 2006). Alimentação inapropriada ou comprometimento do fluxo de nutrientes materno-fetal causam alterações marcantes no metabolismo materno e modificam a nutrição fetal, determinando novas adaptações fetais durante seu desenvolvimento no meio intrauterino (Holemans *et al.*, 2003; Caluwaerts *et al.*, 2006). Na ausência dessas adaptações, o crescimento pós-natal é prejudicado. As condições de saúde no transcorrer da vida adulta resultam da combinação entre genótipo e fenótipo, que se inicia no período pré-natal, uma vez que o meio ambiente intrauterino influencia o desenvolvimento embriofetal, sendo permanentemente modificadas em relação à fisiologia e metabolismo. Este efeito é conhecido como “origem fetal das doenças adultas” (Barker, 1997; Kanaka-Gantenbein, 2010; Hanson & Gluckman, 2011). Assim, a natureza da programação fetal é de extrema importância e envolve muitas doenças que se mantêm em sucessivas gerações (Fernandez-Twinn & Ozanne, 2006; Aerts & Van Assche, 2006; Zambrano, 2009). Sabe-se que o ambiente intrauterino balanceado é essencial para o desenvolvimento normal do concepto e que, se o ambiente uterino for modificado devido a alterações no metabolismo materno, os processos essenciais para a regulação homeostática do organismo ficarão comprometidos, predispondo ao aparecimento de malformações congênitas e a doenças na fase adulta (Holemans *et al.*, 2003).

A incidência de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino (RCIU) é de aproximadamente 3% a 7% na população mundial (Romo *et al.*, 2009). As conseqüências de RCIU incluem distúrbios metabólicos e hematológicos, alterações termoregulatórias, retinopatia de prematuridade, que contribuem para morbidade perinatal. Os distúrbios metabólicos estão relacionados ao metabolismo da glucose e de ácidos graxos. É bem conhecido que indivíduos que apresentam pobre crescimento *in utero* são mais susceptíveis a *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), obesidade, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina (também chamados de Síndrome metabólica) (Longo *et al.*, 2012).

A gestação é um estado inflamatório que aumenta a susceptibilidade ao desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, levando a aumento do quadro de estresse oxidativo e danos no DNA. No entanto em uma gestação saudável, os danos no DNA são reparados de forma eficaz. Com o estilo de vida moderna, isto é, exposição a poluentes ambientais, dieta desequilibrada e falta de exercício físico, o estado inflamatório, estresse oxidativo e os danos no DNA aumentam,

contribuindo para o aparecimento de complicações na gestação (Furness *et al.*, 2011). Visando minimizar estas complicações, muitos especialistas recomendam a prática de exercício físico. Nascimento *et al.* (2012) relatam que o exercício físico é benéfico para mulheres durante a gestação e no período pós parto e que não está associado a riscos nos recém-nascidos e pode levar a mudanças no estilo de vida causando benefícios a longo prazo.

Um ambiente intrauterino desfavorável pode ser simulado por diversos modelos experimentais, dentre eles o uso de corticosteróides (Nyirenda *et al.*, 1998), redução do fluxo de sangue uterino por ligamento bilateral das artérias uterinas (Jansson & Lambert, 1999; Simmons *et al.*, 2001), hipertensão arterial crônica (Bassan *et al.*, 2005), desnutrição proteica (Dahri *et al.*, 1991) e droga beta-citotóxica para indução do diabetes (Volpato *et al.*, 2006, 2008, 2009). Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que ratas adultas com diabetes induzido por *streptozotocin* (STZ), um agente químico que causa necrose das células beta-pancreáticas apresentaram glicemia superior a 300 mg/dL (diabetes grave) e seus descendentes nasceram com restrição de crescimento intrauterino (RCIU), i.e., pequenos para a idade de prenhez (PIP) (Damasceno *et al.*, 2011, Volpato *et al.*, 2008; Volpato *et al.*, 2009; de Souza *et al.*, 2009). Além disso, as ratas com diabetes grave e seus descendentes apresentaram aumento no nível de danos no DNA (genotoxicidade) (Lima *et al.*, 2008). Há pouca informação se o exercício físico está relacionado ou não aos danos genéticos. Vários autores já confirmaram o efeito do exercício aumentando os danos no DNA em animais de laboratório (Pozzi *et al.*, 2010; Wierzba *et al.*, 2006) e em humanos (Mastaloudis *et al.*, 2004).

Considerando que a hiperglicemia materna, causada pelo quadro de diabetes grave em animais de laboratório, aumenta a frequência de recém-nascidos RCIU e promove maior genotoxicidade, o que contribui para o aparecimento de complicações na vida adulta em função de um ambiente intrauterino desfavorável, pretende-se aplicar o exercício físico na fase adulta (prenhez) de ratas RCIU visando interferir na programação fetal para prevenir as doenças crônicas de seus descendentes.

O objetivo deste estudo é avaliar a influência do exercício físico na prenhez de ratas Wistar que nasceram com restrição de crescimento intrauterino frente às possíveis alterações transgeracionais. Especificamente pretendem-se avaliar pesos corpóreos, glicemias e intolerância à glicose durante a prenhez; determinar os níveis de danos no DNA maternos e dos recém-nascidos e correlacionar os níveis de danos no DNA maternos com os dos recém-nascidos.

MATERIAIS E MÉTODO

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, em idade reprodutiva (três meses), pesando aproximadamente 220g, e ratos Wistar pesando em torno de 250g. Os animais foram adquiridos do Centro de Investigação Biológica (CEMIB – Unicamp, Campinas, Estado de São Paulo, Brasil) e adaptados no Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de nossa Instituição.

Seqüência Experimental

Geração F₀

Período de Diabetogênese - Indução do diabetes

O diabetes foi induzido por *streptozotocin* (STZ – SIGMA Chemical Company, St. Louis, Millstone, EUA). STZ foi dissolvido em tampão citrato (0,1M, pH 4,5) e administrado via intravenosa (veia da cauda) na dose de 40 mg/kg de peso corpóreo para constituir o grupo diabético (Geração F₀). A glicemia foi avaliada no 7º dia pós-administração de STZ com uso de glicosímetro convencional (One-Touch Ultra *Johnson & Johnson*®), que expressa o valor em miligramas por decilitro (mg/dL). Para critério de inclusão dos animais no grupo com diabetes grave (DG), foi considerada uma glicemia superior a 300 mg/dL (Rudge *et al.*, 2007; Volpato *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2010) e, para as ratas não-diabéticas (controle), que receberam somente o veículo (tampão citrato), foi considerada glicemia inferior a 120 mg/dL.

Período de Acasalamento

Após o período de diabetogênese, as ratas controle e diabéticas iniciaram a fase de acasalamento com duração máxima de 15 dias, que envolve pelo menos três ciclos estrais. Cada conjunto de quatro ratas foi colocado em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha, na presença de um rato macho não-diabético durante o período noturno. Este procedimento foi realizado até atingir o número de réplicas em cada grupo experimental. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os esfregaços vaginais das fêmeas foram colhidos pela introdução de Cotonete® embebido em solução fisiológica a 0,9% para análise em microscópio de luz. O fator indicativo de prenhez foi a presença de espermatozóides, sendo considerado dia zero de prenhez (Damasceno *et al.*, 2002; Damasceno *et al.*, 2008). As ratas F₀ que não acasalaram neste período foram consideradas inférteis (Damasceno *et al.*, 2002) e foram mortas por anestesia com tiopental

sódico (Thiopentax[®] - 50 mg/kg de peso corpóreo).

Período de Prenhez

Durante a prenhez e a lactação, as ratas (controle e diabéticas) F₀ foram mantidas em gaiolas individuais e, nestes períodos, foram colhidas amostras de sangue por punção da parte distal da cauda para determinação da glicemia materna por glicosímetro convencional para confirmação do diabetes grave e normoglicemia das ratas controle. Após o período de amamentação da prole, as ratas da geração F₀ foram mortas por anestesia com tiopental sódico (Thiopentax[®] - 50 mg/kg) porque o objetivo foi estudar exclusivamente as sucessivas gerações (F₁ e F₂). As ratas não-diabéticas que receberam o veículo foram utilizadas posteriormente em outros experimentos.

Geração F₁

Obtenção da Geração F₁

Os recém-nascidos (RN) foram obtidos por parto vaginal a partir da Geração F₀. Após o nascimento, os RN foram pesados e foi realizada sexagem dos mesmos. Os RN fêmeas (F₁) foram mantidos na presença da mãe para amamentação durante 21 dias, com número máximo de oito fêmeas, correspondentes aos oito tetos de cada mãe, para que a distribuição alimentar materna fosse equivalente para toda a prole. Os RN do sexo masculino só foram utilizados neste projeto para completar o número de oito filhotes porque o objetivo foi avaliar exclusivamente as alterações transgeracionais sob o ponto de vista do sexo feminino. Além disso, os RN machos oriundos de mães diabéticas (F₀) não foram utilizados em outro ensaio, visto que poderiam apresentar alterações metabólicas decorrentes da presença do diabetes materno, sendo então mortos por anestesia com tiopental sódico (Thiopentax[®] - 50 mg/kg). Os RN machos oriundos de mães controle foram reutilizados em outros ensaios.

Classificação dos pesos corpóreos dos recém-nascidos F₁

A classificação dos pesos corpóreos fetais foi realizada de acordo com a média \pm 1,0 x desvio-padrão dos pesos fetais obtidos da prole das ratas controle, que definiu três classes diferentes de pesos (Corvino & Damasceno, 2013) em: **AIP** – recém-nascidos de peso adequado para idade de prenhez: peso corpóreo compreendido entre a média de peso do grupo controle mais ou menos 1,0 x desvio-padrão; **PIP** – recém-nascidos pequenos para idade de prenhez: peso corpóreo inferior à média de peso do grupo controle menos 1,0 x desvio-padrão e **GIP** – recém-nascidos grandes para idade de prenhez: peso corpóreo superior à média de peso do grupo controle mais 1,0 x desvio-padrão.

O segundo critério de inclusão para a geração F_1 foi a obtenção de RN classificados como PIP originados de ratas diabéticas e a obtenção de RN AIP originados de ratas não-diabéticas.

Período Pós-desmame e Acasalamento

No 22º dia de vida pós-natal (equivalente ao 1º dia de desmame), as ratas F_1 foram separadas de suas mães e mantidas até a fase adulta. Na fase adulta (em torno do 90º dia de vida), as ratas da geração F_1 (AIP e PIP) foram submetidas ao acasalamento com ratos Wistar machos não-diabéticos, conforme procedimento realizado com as ratas da geração F_0 .

Período de Prenhez

Durante a prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais e distribuídas em quatro grupos experimentais (n mínimo = 4 ratas com prenhez a termo com filhotes):

- Ratas (filhas de mães não-diabéticas) que nasceram com pesos adequados (AIP) e não foram submetidas à nataçãõ,
- Ratas (filhas de mães não-diabéticas) AIP e foram submetidas à nataçãõ,
- Ratas (filhas de mães diabéticas) que nasceram com pesos inferiores (PIP) e não foram submetidas à nataçãõ,
- Ratas (filhas de mães diabéticas) PIP e foram submetidas à nataçãõ,

Geração F₀: Fase adulta
Ratas normoglicêmicas (não-diabéticas) e com diabetes grave (diabéticas)

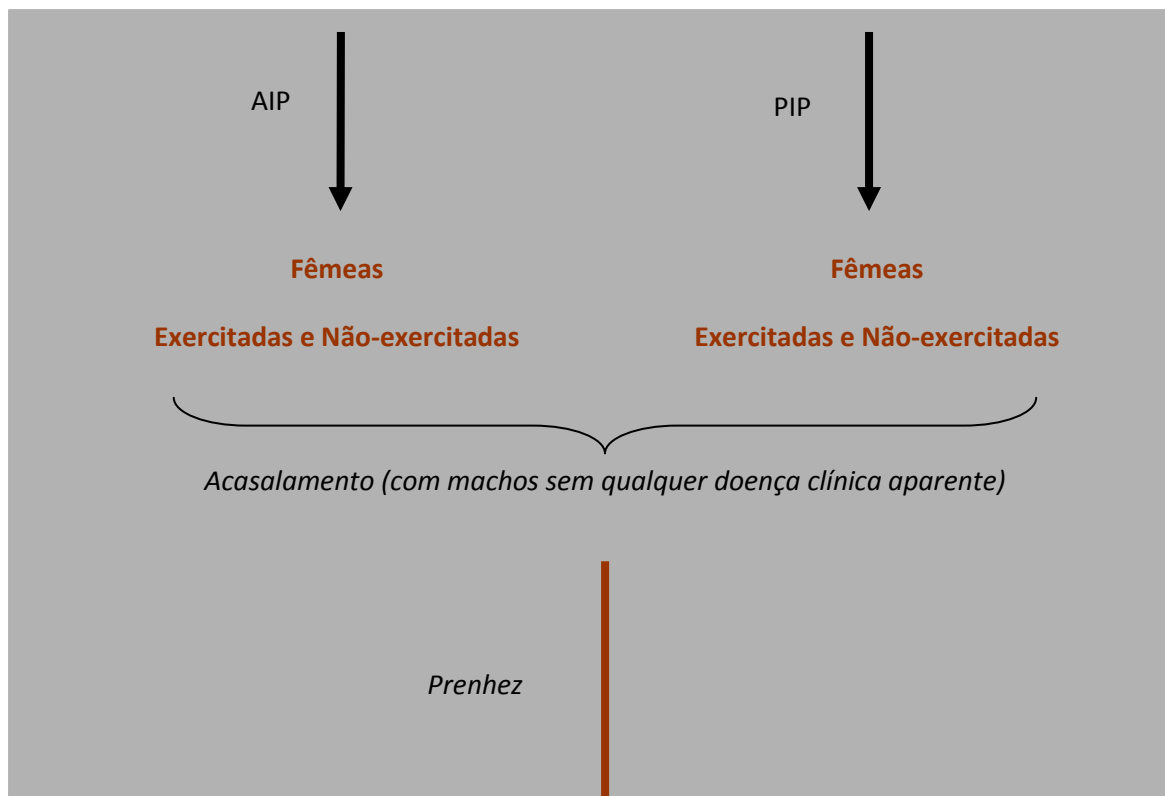


Acasalamento



Geração F₁

Ao nascimento: classificação dos pesos corpóreos dos fetos



Estudo dos dados e da genotoxicidade materna cujas fêmeas (AIP ou PIP), exercitadas ou não, acasalaram com machos não-diabéticos (sem qualquer intervenção ou doença aparente)

Geração F₂

Ao nascimento: Estudo de danos no DNA (genotoxicidade) dos recém-nascidos com 10 dias de vida pós-natal

Intervenção: Prática do exercício físico (Natação)

Uma semana antes do início da prática do exercício físico, as ratas dos grupos exercitados (PIP e AIP) foram colocadas diariamente em tanques de cimento (100 cm de comprimento x 70 cm de largura x 60 cm de profundidade), contendo nível máximo de 10 cm de água aquecida a temperatura de 31°C durante 10 minutos. Este procedimento permitiu a adaptação dos animais ao meio líquido, sem proporcionar condicionamento físico. O programa de natação, desenvolvido para a prática de exercício, seguiu a padronização de Volpato *et al.* (2006). As ratas submetidas ao exercício foram colocadas nos mesmos tanques de adaptação ao meio líquido, contendo 40 cm de água a 31°C, nível suficiente para que fossem estimuladas a nadar, sem sobrecarga adicional ao corpo. Esta atividade foi praticada diariamente em horário fixo durante seis dias por semana. A duração inicial foi de 20 minutos, com aumento progressivo de 10 minutos por dia até o máximo de 60 minutos, este tempo foi mantido até o 20º dia de prenhez.

Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

No 17º dia de prenhez, foi realizado o TOTG para avaliação do desenvolvimento de alterações do metabolismo glicêmico, um marcador empregado rotineiramente na clínica, de acordo com o protocolo clínico para diagnóstico do diabetes, em todas as ratas. Após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa da cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Logo após, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 10, 20, 30 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, foram determinadas as glicemias (Mello *et al.*, 2001) e também estas medidas foram avaliadas pela estimativa da área total sob a curva usando matematicamente o método trapezoidal (Tai, 1994).

Avaliação da glicemia e peso materno

Nas tardes dos dias 0, 7º, 14º e 20º de prenhez, foram realizadas pesagens corpóreas e determinações glicêmicas utilizando glicosímetro convencional.

Coleta de amostras de sangue total das ratas F₁ para determinação de danos no DNA

No final do experimento (10º dia pós-parto), foram coletados amostras de sangue total das mães F₁ (volume de 500µl) em um *ependorf* contendo 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e 400µl de RPMI 1640. Em seguida, foram levados para o freezer a -20° C por 24 horas. No dia seguinte, as amostras foram levadas para o freezer a -80° C e permaneceram lá até o preparo das lâminas para análise de danos no DNA (Netto & Damasceno, 2013)

Geração F₂

Morte e obtenção das amostras de sangue

Após o nascimento, foi realizada pesagem e sexagem de cada RN. Os recém-nascidos (F₂), obtidos por parto vaginal das ratas da Geração F₁, foram anestesiados e mortos para análise de danos no DNA no 10º dia de vida, pois esse período corresponde à fase de desenvolvimento do recém-nascido humano que acabou de desmamar (Quinn, 2005).

Coleta de amostras de sangue total de recém-nascidos (10º dia de vida pós-natal) para determinação de danos no DNA

Foram coletadas amostras de sangue de dois recém-nascidos (RN) por mãe (volume mínimo de 500µl de sangue total dos RN). Cada *ependorf* continha uma mistura de 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e 400µl de RPMI 1640. Em seguida, foram levados para o freezer a -20°C por 24 horas. No dia seguinte, as amostras foram levadas para o freezer a -80°C e permaneceram lá até o preparo das lâminas para análise dos danos por no máximo quatro meses (Hininger *et al.*, 2004).

Teste do Cometa

Para a avaliação dos níveis de danos no DNA, foram analisadas amostras do sangue total de dois recém-nascidos de cada mãe por grupo. Para esse teste, foram utilizados os seguintes materiais: agarose com ponto de fusão normal (*Normal Melting Point* - NMP) e agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* - LMP) (Collins *et al.*, 1998), cloreto de sódio, brometo de etídio, dimetilsulfóxido (DMSO), etil-diaminotetracetato de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, N-Lauroil-sarcosinato, tampão salina fosfato (PBS) livre de cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺), Tris e Triton X-100.

Preparo das lâminas

Cada lâmina foi imersa em uma solução de agarose NMP e PBS livre de cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺) e colocadas para secar em temperatura ambiente.

Preparo das amostras de sangue total e confecção de lâminas

Com o auxílio de micropipeta, o sangue total das mães e dos RN (20µl) foram misturados à agarose LMP (120µl) e colocados sobre a lâmina com agarose NMP. Em seguida, foram colocadas lamínulas sobre as lâminas e foram levadas a geladeira (4°C) a fim de que a agarose se solidificasse. Foram feitas duas lâminas por amostra. Na etapa seguinte, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise previamente gelada contendo NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10mM), Triton X-

100 (1ml), DMSO (10 mL), N-Lauroil-sarcosinato (1%) e levadas à geladeira para obtenção dos nucleóides. As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com PBS gelado por 5 minutos.

Eletroforese

O Teste do Cometa foi realizado segundo o protocolo descrito por Tice (2000) com algumas modificações (Lima *et al.*, 2008). As lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese horizontal onde foram incubadas em solução tampão de eletroforese (pH=13), composta por NaOH e EDTA por 20 minutos a 4° C. Em seguida, foi realizada a corrida de eletroforese (25v, 30 minutos e 300 mA). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em Tris (pH=7,5) durante 15 minutos, fixadas em etanol a 100% e secas à temperatura ambiente.

Coloração

Após secagem, as lâminas foram coradas com 50µL de solução de brometo de etídio (20µg/mL). Cada lâmina foi coberta por lamínula e analisada imediatamente.

Análise das lâminas

As amostras das lâminas foram analisadas usando sistema de escore visual, sendo consideradas cinco diferentes classes (de 0 - sem cauda a 4 – pontuação máxima de danos no DNA). Um total de 100 nucleóides por amostra foram analisados. Para cada nucleóide analisado foi atribuído o valor de 0 a 4 de acordo com sua característica para cada lâmina (Collins *et al.*, 2004). Além da análise por escore, as lâminas foram avaliadas em microscópio de fluorescência num aumento de 400x. Foram observados 100 nucleóides por amostra (50/lâmina), por sistema de análise de imagem automática (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK*). *Tail intensity* (definido como os valores de intensidade na região da cauda menos a região da cabeça, dado em %) foram selecionados como indicadores de danos de DNA (Prado *et al.*, 2010).

Análise Estatística

A comparação dos valores do *score* visual, obtidos nos diferentes testes empregados utilizando o teste do cometa, foi realizada pelo Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Para a comparação dos níveis de danos no DNA nos testes 1, 2, 3 e 4, analisada pelo *software (tail intensity)*, foi empregada a Distribuição Gama. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado na análise de comparações entre as glicemias durante a prenhez e entre os valores nos diferentes momentos do teste oral de tolerância à glicose. Com relação à análise da classificação dos pesos corpóreos dos recém-nascidos, foi empregado o teste

exato de Fisher. $p < 0,05$ foi considerado como limite de significância estatístico.

RESULTADOS

DADOS MATERNOS

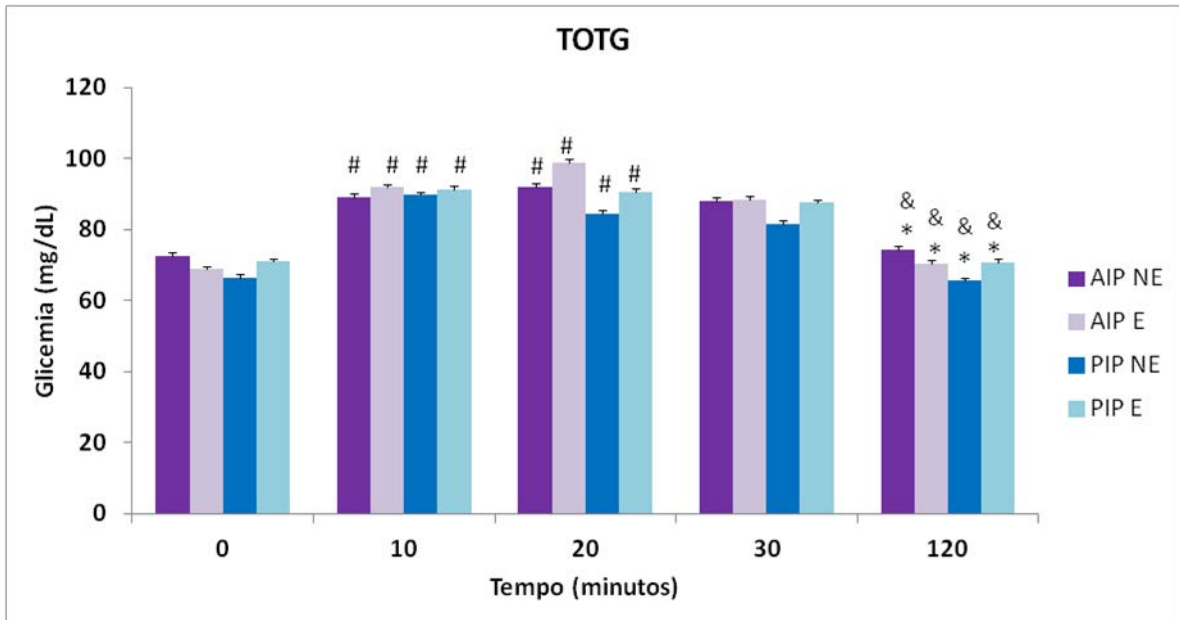
Geração F₀

A glicemia e a avaliação dos pesos corpóreos realizados nos dias 0 e 20 de prenhez (dados não mostrados) foram feitos apenas para confirmação da presença de hiperglicemia das ratas diabéticas e de normoglicemia das ratas controle.

Geração F₁

A figura 1 ilustra o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Foi observado que os grupos experimentais (AIP e PIP exercitados ou não) não apresentaram glicemias superiores a 140 mg/dL em nenhum dos pontos analisados no teste (0, 10, 20, 30 e 120 minutos). Não houve ($p > 0,05$) diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos fixando cada tempo do TOTG. Considerando cada grupo, a comparação das glicemias entre os tempos do TOTG mostrou que o momento 0 diferiu estatisticamente dos tempos 10 e 20 minutos e os tempos 10 e 20 diferiram de forma estatisticamente significativa do momento 120.

Figura 1. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) aplicado no 17º dia de prenhez de ratas AIP NE (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, não submetidas ao exercício-NE), AIP E (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, submetidas ao exercício-E), PIP NE (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, não submetidas ao exercício-NE), PIP E (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, submetidas ao exercício-E).



Dados apresentados como média ± desvio padrão

diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo 0

* diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo 10

& diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo 20

p<0,05 – Teste Exato de Fisher

A tabela 1 mostra os resultados dos níveis de danos no DNA das ratas-mães no 10º dia pós-parto. Foi demonstrado que as ratas AIP e PIP exercitadas apresentaram menor nível de danos no DNA ($p < 0,05$), tanto por *score* visual quanto pela leitura em *software* (*tail intensity*), com relação ao de ratas AIP e PIP não exercitadas. O nível de genotoxicidade nas ratas PIP NE foram superiores ($p < 0,05$) comparado ao das ratas AIP NE. As ratas PIP E apresentaram maior ($p < 0,05$) nível de danos no DNA com relação ao de ratas AIP E.

Tabela 1. Níveis de danos no DNA (*score* visual) no 10º dia pós-parto de ratas AIP NE (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, não submetidas ao exercício-NE), AIP E (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, submetidas ao exercício-E), PIP NE (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, não submetidas ao exercício-NE), PIP E (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, submetidas ao exercício-E).

MÃE	AIP		PIP	
	NE	E	NE	E
Danos no DNA (<i>score</i> visual) ^a	1,79±0,67	1,61±0,86*	2,15±0,85*	1,91±0,79 ^{#, §}
Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) ^b	42,18±20,73	34,37±21,47*	60,63±29,38*	47,39±27,94 ^{#, §}

Dados apresentados como média ± desvio padrão

Legenda: pn = pós-natal.

* diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AIP NE

diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PIP NE

§ diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AIP E

^a $p < 0,05$ – Teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn.

^b $p < 0,05$ – Distribuição Gama

DADOS DOS RECÉM-NASCIDOS (10º DIA DE VIDA)

Geração F₂

As ratas-mães AIP E apresentaram porcentagem maior ($p < 0,05$) de recém-nascidos (RN) classificados como PIP em relação às mães AIP NE. A geração F₁ AIP E apresentou porcentagens menores ($p < 0,05$) de RN AIP e GIP comparadas às de mães AIP NE. Nas ratas-mães PIP E, foi verificada proporção maior ($p < 0,05$) de RN PIP com relação à de ratas PIP NE (TABELA 2).

TABELA 2. Classificação dos pesos corpóreos dos recém-nascidos (ao nascimento) de ratas AIP NE (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, não submetidas ao exercício-NE), AIP E (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, submetidas ao exercício-E), PIP NE (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, não submetidas ao exercício-NE), PIP E (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, submetidas ao exercício-E).

	Geração F ₁			
	AIP NE	AIP E	PIP NE	PIP E
Geração F ₂				
PIP	34/103 (33%)	92/128 (72%)*	42/78 (54%)	76/105 (72%) [#]
AIP	54/103 (52%)	33/128 (26%)*	31/78 (39%)	26/105 (25%)
GIP	15/103 (14%)	3/128 (2%)*	5/78 (6%)	3/105 (2%)

Dados apresentados como a relação entre o número de fetos classificados como PIP, AIP ou GIP e o número total de recém-nascidos.

() = porcentagem de recém-nascidos em suas respectivas classificações

* $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significativa com relação às ratas mães AIP NE (Teste Exato de Fisher)

[#] $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significativa com relação às ratas mães PIP NE (Teste Exato de Fisher)

A tabela 3 mostra que as glicemias dos recém-nascidos das ratas dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dias 5 e 9 pós-natais. Com relação ao nível de danos no DNA, não houve diferença entre os sexos independente dos grupos e os RN do grupo AIP E apresentaram maior genotoxicidade ($p < 0,05$) em relação aos de ratas AIP NE, PIP NE e PIP E. Houve maiores ($p < 0,05$) danos no DNA de RN de mães PIP NE comparados aos de mães AIP NE. Os RN de mães PIP E mostraram menores ($p < 0,05$) níveis de danos em relação aos de mães PIP NE.

TABELA 3. Glicemias no período neonatal e danos no DNA (*score visual*) no 10º dia pós-natal de recém-nascidos de ratas AIP NE (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, não submetidas ao exercício-NE), AIP E (ratas classificadas como adequadas para idade de prenhez-AIP, submetidas ao exercício-E), PIP NE (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, não submetidas ao exercício-NE), PIP E (ratas classificadas como pequenas para idade de prenhez-PIP, submetidas ao exercício-E).

	AIP NE		AIP E		PIP NE		PIP E	
	RN MACHO	RN FÊMEA	RN MACHO	RN FÊMEA	RN MACHO	RN FÊMEA	RN MACHO	RN FÊMEA
Glicemia 5º dia	113,7±13,3	125,5±9,3	123,0±13,1	130,2±17,8	113,7±18,0	122,5±13,9	111,4±8,7	117,4±5,9
Glicemia 9º dia	131,2±19,4	129,7±11,8	126,2±3,5	122,4±11,6	120,7±26,1	114,0±26,9	121,4±19,9	111,2±16,2
Danos DNA (<i>score visual</i>)^A	2,0±0,9 ^a	1,7±0,8 ^a	2,5±0,9 ^b	2,5±1,0 ^b	2,2±1,1 ^c	2,1±0,9 ^c	1,9±0,8 ^{d,e}	2,0±0,8 ^{d,e}
Danos DNA (<i>tail intensity</i>)^B	38,3±21,2 ^a	36,9±22,0 ^a	62,0±23,8 ^b	63,4±25,7 ^b	60,5±21,0 ^c	62,4±24,3 ^c	37,7±19,2 ^{d,e}	39,4±21,5 ^{d,e}

Dados apresentados como média ± desvio padrão

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b, c, d, e) similares não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$)

^b diferença estatisticamente significativa entre AIP E e AIP NE; ^c diferença estatisticamente significativa entre PIP NE e AIP NE; ^d diferença estatisticamente significativa entre PIP E e PIP NE; ^e diferença estatisticamente significativa entre PIP E e AIP E;

^A $p < 0,05$ – Teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn; ^B $p < 0,05$ – Distribuição Gama

DISCUSSÃO

No presente estudo, as ratas AIP e PIP exercitadas ou não (geração F₁) não mostraram alteração nos valores glicêmicos no teste oral de tolerância à glicose, mostrando que estas ratas não apresentaram intolerância à glicose. Isto pode ser explicado pelo fato do nosso experimento ter sido realizado na fase inicial de vida adulta e não na fase tardia, como observado nos trabalhos científicos desenvolvidos pela equipe de Zambrano (Zambrano, 2009). Essa autora verificou que ratas nascidas com restrição de crescimento intrauterino (RCIU) com idade superior a 130 dias de vida apresentaram alterações metabólicas, dentre elas intolerância à glicose, durante a prenhez. Com relação aos nossos achados, apesar da natação não ter apresentado efeitos sobre a glicemia nas ratas AIP e PIP, o exercício físico regular em idade mais avançada em recém-nascidos PIP/RCIU poderia prevenir e normalizar as alterações metabólicas causadas por ambiente intrauterino desfavorável (Eriksson et al., 2004, exercício protege contra glicose intolerância)

As ratas-mães AIP e PIP exercitadas durante a prenhez apresentaram redução nos níveis de danos no DNA. O aumento de ERO induzido pelo exercício estimula as respostas de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Selman et al., 2002), reduzindo o estresse oxidativo (Weissgerber et al., 2006; Furness et al., 2011), levando assim a uma redução nos danos no DNA, o que corrobora com os resultados encontrados em nossos animais. No entanto, as ratas PIP que não praticaram exercício apresentaram aumento no nível de danos no DNA. Isto mostra a influênica do diabete grave, que promoveu um ambiente intrauterino desfavorável levando a alterações na vida adulta de sucessivas gerações, confirmando a teoria da programação fetal (Baker, 1997).

Quando o exercício físico (natação) foi aplicado a ratas AIP e PIP durante a prenhez, foi verificado que essas ratas apresentaram maior porcentagem de descendentes PIP, sugerindo que o exercício durante a prenhez foi associado com alteração no peso ao nascimento. Os efeitos do exercício materno durante a gestação com relação ao crescimento fetal ainda são muito discutidos. Estudos em humanos mostram que o exercício físico na gravidez está associado com peso reduzido ao nascimento (Bell RJ *et al.*, 1995; Dwarkcenath *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 2010), peso inalterado (Sternfeld *et al.*, 1995) ou aumentado (Clapp *et al.*, 2000; Hatch et al., 1993) nos descendentes de mulheres exercitadas. As diferenças existentes entre os estudos sobre exercício podem ser decorrentes de diversas variáveis, dentre elas o tipo e intensidade de exercício, momento de aplicação de exercício na gravidez ou o tipo de supervisão ao exercício (Clapp *et al.*, 2000). Essas variáveis também podem interferir na oxigenação e disponibilidade de substratos na interface materno-fetal em função da

dependência do crescimento e desenvolvimento placentário (Clapp et al., 2006; 2003). Corroborando com nossos achados, Volpato et al. (2013) verificaram diminuição na área de troca materno-fetal (labirinto) nas placentas de ratas submetidas à natação seguindo o mesmo protocolo deste estudo. Oliveira et al. (2004) verificaram que ratas prenhes submetidas à natação por 60 minutos por dia também apresentaram filhotes com peso reduzido ao nascimento. Uma das justificativas para explicar a relação entre natação aplicada às ratas-mães e aumento percentual de RN PIP pode ser a presença de estresse materno induzido pela intensidade do exercício físico durante a prenhez sobre o peso ao nascimento. Pinto et al. (1995) concluíram que esse tipo de estresse pode persistir através de duas gerações sucessivas.

No presente estudo, os filhotes de ratas AIP E apresentaram os maiores níveis de danos no DNA. Os resultados com relação aos efeitos do exercício físico (natação, esteira, rampa, aro) nos danos genéticos são conflitantes. É sugerido que o exercício físico aumenta o consumo de oxigênio de acordo com sua intensidade, que está associada com a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Davies et al., 1982). ERO são responsáveis por danos teciduais, inativação enzimática, peroxidação lipídica e quebras de fitas simples no DNA, promovendo genotoxicidade. Por outro lado, o aumento de ERO induzido pelo exercício estimula as respostas de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (ref 5 artigo Pozzi). Diferentes tipos de exercício como alta intensidade e curta duração (Hartmann et al., 1995; Mars et al., 1998; Niess et al., 1996) intensidade e duração moderadas (Niess et al., 1998) e exercício intenso podem apresentar a mesma quantidade de danos no DNA analisadas pelo teste do cometa. Pozzi et al. (2010) analisaram o nível de danos no DNA em ratos machos pelo teste do cometa (*tail intensity*) associado ao exercício agudo em diferentes fases (0, 2 e 6 horas pós exercício). Os animais foram submetidos a um programa de exercício em esteira motorizada até atingirem a exaustão e apresentaram aumento nos níveis de danos no DNA de 2 e 6 horas pós exercício agudo, sugerindo que este contribui para uma instabilidade genética.

Os filhotes de ratas PIP E apresentaram redução na genotoxicidade a ponto de não apresentar diferenças com relação aos filhotes advindos de ratas AIP NE (controle). Esse fato poderia estar relacionado à teoria da programação fetal. Uma vez que as ratas PIP estão adaptadas a um ambiente intrauterino desfavorável desde a sua concepção, a intervenção com esse tipo de exercício foi mais uma variável estressogênica a que essas se adaptaram. No entanto, o mesmo não foi verificado com as ratas AIP E visto que são advindas de um ambiente intrauterino adequado, sem outros fatores estressogênicos.

Portanto, nossos resultados mostraram que o exercício físico (natação) contribuiu para a estabilidade genética materna, demonstrada pela redução da genotoxicidade, mas causou

comprometimento no peso dos recém-nascidos, evidenciado pela restrição de crescimento intrauterino. Os mecanismos envolvidos no aumento de danos no DNA nos recém-nascidos de ratas controle exercitadas ainda precisam ser elucidados. No entanto, quando o exercício foi aplicado a ratas-mães com RCIU, advindas de um ambiente desfavorável no útero, houve efeito benéfico na redução dos níveis de danos no DNA de seus descendentes. Desta forma, as gestantes devem ser encorajadas a praticar exercício físico, mas devem ser supervisionadas por especialistas considerando suas limitações, o tipo e a intensidade do exercício e o momento apropriado na gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38: 894-903.
- Barker DJP. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition.* 1997; 13: 807.
- Bassan H, Bassan M, Pinhasov A, Kariv N, Giladi E. The pregnant spontaneously hypertensive rat as a model of asymmetric intrauterine growth retardation and neurodevelopmental delay. *Hypertens Pregnancy.* 2005; 24(3): 201-11.
- Bell RJ, Palma SM, Lumley JM. The effect of vigorous exercise during pregnancy on birth weight. *Aust NZ J Obstet Gynaecol.* 1995;35(1): 46-51.
- Caluwaerts S, Holemans K, Van Bree R, Verhaeghe J, Van Assche FA. Aging does not aggravate the pregnancy-induced adaptations in glucose tolerance in rats. *Metabolism.* 2006; 55: 409-14.
- Clapp JF, Kim H, Burciu B, Lopez B. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(6):1484-8.
- Clapp JF. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;110(1):80-5.
- Clapp JF. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. *Placenta.* 2006;27(6-7):527-34.
- Collins AR, Raslová K, Somorovská M, Petrovská H, Ondrusová A, Vohnout B, *et al.* DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(3): 373-7.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3):249-61.
- Corvino SB. Exercício físico no diabete transgeracional de ratas: efeito a *performance* reprodutiva e nos hormônios sexuais [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2012.
- Damasceno DC, Volpato GT, Mattos IMP, Rudge MVC. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci.* 2002; 72(3-4): 235-44.
- Damasceno DC, Kempinas WDG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC, *et al.* Anomalias congênitas - estudos experimentais. Botucatu: Ed. Médica; 2008.
- Damasceno DC, Kiss AC, Sinzato YK, de Campos KE, Rudge MV, Calderon IM, *et al.* Maternal-fetal outcome, lipid profile and oxidative stress of diabetic rats neonatally exposed to streptozotocin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011; 119(7): 408-13.
- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet J. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes.* 1991; 40(Suppl 2):115-20.

- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107(4):1198–1205.
- De Souza MS, Lima PH, Sinzato YK, Rudge MV, Pereira OC, Damasceno DC. Effects of cigarette smoke exposure on pregnancy outcome and offspring of diabetic rats. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18(4): 562-7.
- De Souza MSS, Sinzato YK, Lima PHO, Calderon IMP, Damasceno DC. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20(4): 547-52.
- Dwarkanath P, Muthayya S, Vaz M, Thomas T, Mhaskar A, Mhaskar R, *et al.* The relationship between maternal physical activity during pregnancy and birth weight. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007; 16(4):704–10.
- Eriksson JG, Ylihärsilä H, Forsén T, Osmond C, Barker DJ. Exercise protects against glucose intolerance in individuals with a small body size at birth. *Prev Med.* 2004; 39(1):164-7.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Phys Behav.* 2006; 88: 234-43.
- Furness DLF, Dekker GA, Roberts CT. DNA damage and health in pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2011; 89(2):153-62.
- Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: Moving from biological concepts to interventions and policy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011; 115 (1): S3-5.
- Hatch MC, Shu XO, McLean DE, Levin B, Begg M, Reuss L, *et al.* Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol.* 1993; 137(10):1105–14.
- Hartmann A; Niess A; Grunert-Fuchs M; Poch B; Speit G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 1995; 346(4):195-202.
- Hininger I, Chollat-Namy A, Sauvaigo S, Osman M, Faure H, *et al.* Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res.* 2004. 14; 558(1-2): 75-80.
- Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Invest.* 2003; 10(7): 392-99.
- Hopkins SA, Baldi JC, Cutfield WS, McCowan L, Hofman PL. Exercise training in pregnancy reduces offspring size without changes in maternal insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(5): 2080–88.
- Jansson T, Lambert G. Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3–4 months of age. *J Hypertens.* 1999; 17(9): 1239-48.
- Kanaka-Gantenbein C. Fetal origins of adult diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1205: 99-105.
- Lima PH, Damasceno DC, Sinzato YK, Souza MSS, Salvadori DMF, Calderon Ide M, *et al.* Levels of DNA damage in blood leukocyte samples from non-diabetic and diabetic female rats and their fetuses exposed to air or cigarette smoke. *Mutation Research.* 2008; 653(1-2): 44-9.
- Longo S, Bollani L, Decembrino L, Comite AD, Angelini M, Stronati M. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26(3): 222-5.
- Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(8): 966-75.
- Mars M, Governder S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249(2):366–370.
- Mello MAR, Souza T, Braga LR, Santos W, Ribeiro IA. Glucose tolerance and insulin action in onosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 2001; 33(1): 63-71.
- Nascimento SL, Surita FG, Cecatti JG. Physical exercise during pregnancy: a systematic review. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2012; 24(6):387-94.
- Netto AO, Gelaleti RB, Serrano RG, Damasceno DC. Different methodologies of thawing of total blood samples for genotoxicity analysis in rats. *Mutation Research.* 2013 (submitted)

- Niess A, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sport Med.* 1996; 17(6):397–403.
- Niess A, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, Dickhuth HH. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness.* 1998; 38(2):111–115.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest.* 1998; 101(10):2174–81.
- Oliveira AO, Fileto C, Melis MS. Effects strenuous maternal exercise before and during pregnancy on rat progeny renal function. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(6):907-11.
- Pinto ML, Shetty PS. Influence of exercise-induced maternal stress on fetal outcome in Wistar rats: inter-generational effects. *Br J Nutr.* 1995;73(5):645-53.
- Pozzi R, Rosa JC, Eguchi R, Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Aguiar O Jr, *et al* . Genetic damage in multiple organs of acutely exercised rats. *Cell Biochem Funct.* 2010; 28(8):632-6.
- Prado RP, dos Santos BF, Pinto CL, de Assis KR, Salvadori DM, Ladeira MS. Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis.* 2010;25(5):483-7.
- Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition.* 2005; 21(6):775-7.
- Romo A, Carceller R, Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol.* 2009; 6(3):332-6.
- Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Abbade JF, Rugolo LMSS. Perinatal Outcome of pregnancies complicated by Diabetes and by Maternal Daily Hyperglycemia Not Related to Diabetes. A Retrospective 10 year Analysis. *Gynecol Obst Invest.* 2000; 50(2): 108-12.
- Rudge MVC, Damasceno DC, Volpato GT, Almeida FC, Calderon IM, Lemonica IP. Effect of *Ginkgo biloba* on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(8): 1095-9.
- Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 401(2):255-61.
- Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of Type 2 diabetes in the rat. *Diabetes.* 2001; 50(10): 2279–86.
- Sternfeld B, Quesenberry CP, Eskenazi B, Newman LA. Exercise during pregnancy and pregnancy outcome. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27(5):634–640.
- Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care.* 1994; 17(2): 152-4.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, *et al*. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3): 206-21.
- Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IM. Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esp.* 2006; 12: 229-33.
- Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MV, Padovani CR, Calderon IM. Effect of Bauhinia 35 orficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2008; 28; 116(1): 131-7.
- Volpato GT, Damasceno DC, Kempinas WG, Rudge MV, Calderon IM. Effect of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19(6): 852-8.
- Volpato GT, Damasceno DC, Sinzato YK, Calderon IMP, Rudge MVC. Effect of exercise after the embryonic implantation in diabetic rats. *Reproductive Sciens.* 2013 (submitted).

- Weissgerber TL, Wolfe LA, Davies GA, Mottola MF. Exercise in the prevention and treatment of maternal–fetal disease: a review of the literature. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006; 31(6):661–74.
- Wierzba TH, Olek RA, Fedeli D, Falcioni G. Lymphocyte DNA Damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57(10):115-31.
- Zambrano E. The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases. *Rev Invest Clin.* 2009; 61(1): 41-52.