



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
BÁSICAS E APLICADAS**

THAÍS LEAL SILVA

**REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS, REPRODUTIVAS E FETAIS DO
TRATAMENTO COM *Morinda citrifolia* NA PREENHEZ DE RATAS COM
DIABETE DE INTENSIDADE MODERADA**

Barra do Garças – MT

Março - 2017

THAÍS LEAL SILVA

**REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS, REPRODUTIVAS E FETAIS DO
TRATAMENTO COM *Morinda citrifolia* NA PRENHEZ DE RATAS COM
DIABETE DE INTENSIDADE MODERADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia – UFMT, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

Co-orientadora: Prof. Dra. Madileine Francely Américo

Barra do Garças - MT

Março - 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S586r Silva, Thaís Leal.
REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS, REPRODUTIVAS E FETAIS DO
TRATAMENTO COM *Morinda citrifolia* NA PREENHEZ DE RATAS COM
DIABETE DE INTENSIDADE MODERADA / Thaís Leal Silva. -- 2017
60 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Tadeu Volpato.

Co-orientadora: Madileine Francely Américo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de
Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Básicas e Aplicadas, Barra do Garças, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Rubiaceae. 2. noni. 3. anomalias viscerais. 4. perda pré-implantação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

THAÍS LEAL SILVA

**REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS, REPRODUTIVAS E FETAIS DO
TRATAMENTO COM *Morinda citrifolia* NA PRENHEZ DE RATAS COM
DIABETE DE INTENSIDADE MODERADA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre de Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Campus Universitário do Araguaia da Universidade Federal de Mato Grosso, pela seguinte banca examinadora:

Data de aprovação: 06/03/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

Orientador

Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT/CUA

Prof^a. Dr^a. Renata Mazaro e Costa

Examinador externo

Universidade Federal de Goiás, UFG/Goiânia-GO

Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina C. Giachini Vitorino

Examinador interno

Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT/CUA

Dedicatória

Aos meus pais, Geraldo Carlos da Silva e Eliana Luiza Leal Silva, com toda gratidão, por nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos, pela paciência, ensinamentos e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Obrigada por todo o amor e carinho recebido. Espero um dia ser exemplo de pessoa como vocês e ser merecedora de todo o esforço e dedicação, principalmente quanto a minha formação.

Agradecimentos

Agradeço antes de tudo à Deus, em sua infinita bondade por ter colocado as oportunidades em minha vida e ter me dado forças para que eu pudesse realizá-las, por me amparar nos momentos difíceis e sempre me guiar e mostrar os caminhos certos, mesmo não sendo os mais fáceis.

À minha família que sempre foi minha base, por todo o amparo e apoio, me auxiliando nas dificuldades, não de deixando fraquejar, e caminhando junto de mim. Aos meus queridos pais, que me apoiaram e incentivaram desde o momento em que decidi me inscrever no mestrado. À minha irmã, Anna Carolina Leal Silva por seu amor e carinho, suas conversas e por sua companhia nas idas à Universidade no período da noite.

Ao meu namorado Victor Pádua, por ser companheiro e amável, por estar sempre ao meu lado, tendo paciência, escutando minhas reclamações, me acalmando nos momentos de estresse, pelos conselhos e apoio constante.

Ao meu orientador, Dr. Gustavo Tadeu Volpato que tenho como exemplo de professor-pesquisador, que me ensinou desde o início o que era a pesquisa científica. Por seu árduo trabalho de ensinar, corrigir, ouvir e sempre estar disposto a ajudar. Por seu compromisso com seus orientandos, paciência, organização e dedicação. Agradeço imensamente por ter me ajudado a crescer como pesquisadora, por me mostrar a satisfação em fazer ciência, me ajudar a ter certeza da escolha da minha profissão “docente-pesquisadora” e por me mostrar todos caminhos de como ser um profissional competente.

À minha co-orientadora Dra Madileine Francely Américo, por suas sugestões no trabalho, por estar sempre disposta a ajudar e por seus conselhos de ser mais paciente e esperar as coisas acontecerem, ensinando que na vida as coisas vêm na hora certa e não quando queremos.

Às minhas amigas do laboratório Larissça Lopes, Verônyca Paula e Andrieli Hauschildt que levarei para toda vida, por me ajudarem durante todo meu experimento,

por escutarem minhas reclamações, por fazer meus dias de trabalho mais divertidos, pelas risadas, conversas, conselhos e por serem minhas companheiras de café.

Aos alunos de iniciação científica Maysa Souza, Cristina Maria, Bruno Stephano e Gabriel Gomes pela amizade e ajuda na realização do experimento.

À todos os alunos e colaboradores da família FISIOTOX, Thaigra Soares, Beatriz Magalhães, Loyane Almeida, Romero Calo, Cristielly Barbosa, Vanessa Caruline, Mariana Pirani, Jalvita Mendonça, Regiani Reboli pela ajuda e por fazerem do ambiente de trabalho um lugar agradável e prazeroso. Em especial à Rafaienne Queiroz, que com sua luz e alegria contagia todos que estão por perto.

Ao professor Dr. Kléber Eduardo de Campos por sua colaboração na qualificação e por estar sempre disposto a solucionar dúvidas.

À professora Dra. Fernanda Gianchini Vitorino e a aluna Vanessa Justina, por sua colaboração na dosagem das citocinas, sugestões e por todo o aprendizado.

Ao professor Me. Weskley da Silva Cotrim que atenciosamente nos concedeu o liofilizador, que foi imprescindível para a realização da pesquisa.

À professora Dra. Maryland Sanchez que gentilmente fez a identificação da planta.

Aos professores da pós-graduação por todos os seus ensinamentos.

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

Aos animais, que sem eles jamais seria possível a realização da pesquisa.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. ”

Charles Chaplin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área sob a curva
BSA	Albumina de soro bovino
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	Diabete tipo 1
DM2	Diabete tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
FISIOTOX	Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MODY	Diabete de maturidade com início na juventude
NK	Natural Killer
PCR	Proteína C-reativa
PIB	Produto interno bruto
ROS	Espécies reativas do oxigênio
STZ	Estreptozotocina
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
Treg	T reguladora
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 O diabete	10
1.2 Binômio diabete e gravidez	11
1.3 Diabete em modelos experimentais	12
1.4 Imunologia no diabete e na gestação	14
1.5 O uso de plantas medicinais no tratamento do diabete	16
1.6 <i>Morinda citrifolia</i>	17
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo Geral	21
1.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção do extrato da planta	22
3.2 Animais	22
3.3 Sequência Experimental.....	23
3.3.1 Período de adaptação	23
3.3.2 Período de diabetogênese.....	23
3.3.2.1 Critérios de inclusão e de exclusão	24
3.3.3 Período de acasalamento.....	24
3.3.4 Período de tratamento	24
3.4 Grupos Experimentais	25
3.5 Resolução da prenhez e obtenção dos dados.....	26
3.5.1 Leucograma.....	26
3.5.2 Extração e quantificação de proteínas	26
3.5.3 Análises imunológicas	26
3.5.4 Desempenho reprodutivo materno	27
3.5.5 Biomarcadores placentários e fetais	27
3.5.6 Análise das malformações externas.....	28
3.5.7 Análise das anomalias viscerais	28
3.5.8 Análise das anomalias esqueléticas e contagem dos pontos de ossificação	28
3.6 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	60
ANEXO I Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para Animais de Pesquisa da UFMT ...	60

RESUMO

Diabetes mellitus é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia provocada pelo defeito absoluto ou relativo na produção e/ou ação da insulina. Durante a gestação, a hiperglicemia pode levar a complicações maternas e fetais, gerando anormalidades metabólicas e reprodutivas. Dessa forma, buscaram-se alternativas para tratar o diabetes e prevenir suas complicações, e uma dessas alternativas é o uso de plantas medicinais, como a *Morinda citrifolia* (família Rubiaceae), conhecida popularmente como Noni. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento do extrato aquoso de *M. citrifolia* na prenhez de ratas com diabetes moderado. Para a realização do trabalho, ratas Wistar normoglicêmicas foram acasaladas e o diabetes foi induzido em fêmeas 24 horas após o nascimento por meio da administração intravenosa de estreptozotocina na dose de 100 mg/kg, os animais dos grupos não diabéticos receberam tampão citrato. Aos 110 dias de vida foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e as ratas que apresentaram dois pontos acima de 140 mg/dL com limite máximo de 300 mg/dL na curva foram consideradas com diabetes de intensidade moderada, para compor os grupos não diabéticos as ratas tiveram que apresentar pontos de glicemia inferiores a 140 mg/dL. Em seguida, as ratas foram acasaladas e randomizadas para comporem os grupos experimentais: Não-diabético – Ratas tratadas com água; Não-diabético Tratado – Ratas tratadas com a planta; Diabético - Ratas diabéticas tratadas com água; Diabético Tratado – Ratas diabéticas tratadas com a planta. O tratamento foi realizado por via oral, diariamente durante toda a prenhez, com o extrato aquoso do fruto de *M. citrifolia* na dose de 750 mg/kg. A glicemia foi medida semanalmente e o TOTG foi realizado novamente no 17º dia de prenhez. No 21º dia de prenhez as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico e foi realizada laparotomia para retirada do útero e dos fetos. Além disso, foram coletadas as placentas e o sangue materno para a realização das análises imunológicas e o leucograma, respectivamente. Os resultados mostraram que o tratamento com a planta não melhorou o metabolismo glicêmico. Contudo, foi observada diminuição na concentração das citocinas interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), no número de implantações, no ganho de peso materno e fetos com morfologia normal e aumento nas taxas de perda pré-implantação no grupo Não-diabético Tratado comparado ao grupo Não-diabético. O grupo Diabético Tratado apresentou aumento das citocinas IFN- γ , TNF- α e interleucina-10 (IL-10) comparadas ao grupo Não-diabético Tratado e aumento de perda pré-implantação em relação ao grupo Não-Diabético. Todos os grupos apresentaram aumento de anomalias viscerais comparadas ao grupo não-diabético. Portanto, pode-se concluir que o tratamento com o extrato aquoso de *M. citrifolia* na dose de 750 mg/kg administrada durante a prenhez alterou parâmetros maternos e imunológicos, podendo ser prejudicial na gestação.

PALAVRAS-CHAVE

Rubiaceae, noni, anomalias viscerais, perda pré-implantação.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by hyperglycemia resulting of absolute or relative defect in the production and/or action of insulin. During pregnancy, hyperglycemia can cause maternal and fetal complications, leading to metabolic and reproductive abnormalities. Consequently, alternatives are sought to treat diabetes and prevent their complications, and one of these alternatives is the use of medicinal plants, such the *Morinda citrifolia* (Rubiaceae family), known as Noni. Therefore, this study sought to investigate the effects of treatment with the aqueous extract of *M. citrifolia* on pregnancy in rats with mild diabetes. For this study, normoglycemic Wistar rats were mated, diabetes was induced in females 24 hours after birth by intravenous administration of streptozotocin at the dose of 100 mg/kg, animals from the non-diabetic groups received citrate buffer. At 110 days of age, the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in the rats, and those with two points above 140 mg/dL (with a maximum limit of 300 mg/dL) were classified as mild diabetes. For the non-diabetic groups, the rats had glycemia points lower than 140 mg/dL. After that, the rats were mated and randomized to compose the experimental groups: Non-diabetic: rats treated with water; Non-diabetic Treated: rats treated with the plant; Diabetic: diabetic rats treated with water; Diabetic Treated: diabetic rats treated with the plant. The treatment was performed daily and orally throughout the pregnancy, with the aqueous extract of the *M. citrifolia* fruit at the dose of 750 mg/kg. Blood glucose was measured weekly and OGTT was performed again on the 17th day of pregnancy. On the 21st day of pregnancy the rats were anesthetized with sodium thiopental and performed a laparotomy to remove the uterus and fetuses. In addition, placentas and maternal blood were collected for immunological analysis and leukogram, respectively. The results showed that treatment with the plant did not improve glycemic metabolism. However, when comparing the groups Non-diabetic Treated and Non-diabetic, it was observed that rats receiving treatment experienced a decrease in the concentration of interleukin-6 (IL-6), interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), number of implantations, maternal weight gain and fetuses with normal morphology and increase in preimplantation loss rates. The Diabetic Treated group showed an increase in IFN- γ , TNF- α and interleukin-10 (IL-10) cytokines compared to the Non-diabetic Treated group and increased of pre-implantation loss compared to the Non-Diabetic. All groups presented increased of visceral abnormalities compared to the Non-diabetic group. Therefore, it can be concluded that the treatment with the aqueous extract of *M. citrifolia* at the dose of 750 mg/kg administered during pregnancy altered maternal and immunological parameters and could be harmful during pregnancy.

KEY WORDS

Rubiacea, noni, visceral anomalies, preimplantation loss.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O diabete

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença crônica e complexa, caracterizada pela redução do controle glicêmico, ocasionada pela deficiência na produção de insulina pelo pâncreas ou pela ineficácia do corpo em utilizar a insulina produzida. O acompanhamento médico e o autocuidado são imprescindíveis para prevenir complicações agudas e riscos a longo prazo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O diabete é um importante problema de saúde pública e sua prevalência tem aumentado nas últimas décadas. Estima-se que em 2014 haviam 422 milhões de adultos com a doença em todo o mundo e em 2040 acredita-se que este percentual aumentará para 642 milhões, sendo que 1 em cada 10 adultos apresentará a doença. A taxa de mortalidade também tem se mostrado alta. Em 2012, 1,5 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença, sendo o número de óbitos maior em países de baixa renda com menores condições de tratamento. Os fatores de risco como sedentarismo, sobrepeso e obesidade têm sido associados ao aumento dos índices do diabete (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

No Brasil há um grande número de pessoas com DM, chegando a 14 milhões em 2015 e estima-se que em 2040 este índice chegará a 23 milhões de pessoas. O índice de crianças com diabete também é alto, chegando a ser o terceiro país no mundo com o maior número de crianças com diabete tipo 1 (DM1), sendo que os primeiros países são os Estados Unidos e a Índia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O impacto econômico global do diabete sobre o sistema de saúde é amplo, não se restringindo somente a custos médicos e medicamentos, mas também gastos relacionados a prevenção, perda de produtividade, mortalidade prematura, além do impacto negativo sobre o produto interno bruto (PIB) dos países, resultando em custos indiretos associados a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Com base em estudos, estima-se que o custo anual com o DM no mundo ultrapasse 825 bilhões de dólares, sendo que mais da metade dos custos recaem sobre países de baixa e

média renda (SEURING *et al.*, 2015; NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

Segundo a Associação Americana de Diabetes (2016), o diabetes é classificado em quatro tipos: DM1, Diabetes tipo 2 (DM2), *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e outros tipos específicos de diabetes. O DM1 é decorrente em geral, da destruição autoimune das células β pancreáticas, levando a uma absoluta deficiência de insulina e, em alguns casos, acarretando em um quadro de cetoacidose. Os mecanismos que desencadeiam a destruição dessas células ainda são incertos, mas a predisposição genética e fatores ambientais podem estar envolvidos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O DM2 abrange os indivíduos que possuem relativa deficiência de insulina e/ou que não conseguem utilizar a insulina produzida pelo corpo de forma eficaz. Na maioria dos casos a doença é assintomática, podendo retardar o diagnóstico, o tratamento e ampliar suas complicações. É o tipo de diabetes que mais vem crescendo mundialmente, representando aproximadamente 90% do diagnóstico de todos os pacientes diabéticos (SEURING *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Em outros tipos específicos de diabetes estão incluídas as síndromes monogênicas do diabetes (diabetes neonatal), diabetes de maturidade com início na juventude (MODY), diabetes induzida por produtos químicos e medicamentos (glicocorticoides e tiazídicos) e doença do pâncreas exócrino (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

O DMG por muitos anos foi definido como qualquer grau de intolerância à glicose com primeiro reconhecimento durante a gestação, porém essa definição foi considerada muito imprecisa. Dessa forma, a partir de 2015 passou a considerar DMG como o diabetes diagnosticado no segundo e terceiro trimestre da gestação, não sendo claramente característico do DM1 ou DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

1.2 Binômio diabetes e gravidez

O DM é uma doença antiga, tendo seus primeiros relatos em papiros egípcios de 1500 a.C. Contudo, a primeira descrição da associação entre diabetes e gravidez ocorreu em 1824 na Alemanha, onde foi relatado polidipsia e glicosúria materna e macrossomia fetal. Até 1922, antes da descoberta da insulina, era comum a infertilidade em mulheres diabéticas, sendo descritas diversas causas para o problema. Após a descoberta da

insulina, houve um aumento de gestações em mulheres diabéticas (NEGRATO & GOMES, 2013).

O diabetes é uma das complicações mais comuns durante a gestação, podendo gerar riscos tanto para a mãe quanto para o recém-nascido. Os riscos maternos incluem cetoacidose diabética, suscetibilidade a infecções, aumento do risco de pré-eclâmpsia e pode acarretar em alterações no fluxo uterino placentário, resultando em restrições nas trocas maternas e fetais. Além disso, a presença do DMG pode levar ao desenvolvimento de DM2 após o período de gestação (PIETRYGA *et al.*, 2005; KAMANA *et al.*, 2015; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

As complicações mais comuns em recém-nascidos que foram expostos ao diabetes são defeitos congênitos no nascimento, macrossomia devido a hiperinsulinemia fetal resultante da hiperglicemia materna, nascimentos prematuros e morte fetal intrauterina (HAWRYLUK *et al.*, 2015). Além disso, a exposição intrauterina ao diabetes pode acarretar riscos futuros para os recém-nascidos, como hipertensão, obesidade e desenvolvimento do DM2 (BLUE *et al.*, 2015).

Os mecanismos moleculares e celulares da embriopatia diabética ainda não estão claros (WENTZEL *et al.*, 2008). Desta forma, aumentou-se o interesse em pesquisar a associação entre o diabetes materno e malformações fetais, sendo que muitos estudos têm sido realizados em animais. As pesquisas utilizando ratas com diabetes induzido quimicamente relataram mortes no período embrionário (reabsorções) e aumento de malformações fetais, ambas decorrentes da hiperglicemia (DAMASCENO *et al.*, 2002; AL GHAFI *et al.*, 2004; DAMASCENO *et al.*, 2011). Também foi observado o aumento de fetos considerados pequenos para a idade de prenhez, alterações nas trocas materno fetais e no fluxo uteroplacentário (AERTS & VAN ASSCHE, 2003; VOLPATO *et al.*, 2015).

1.3 Diabetes em modelos experimentais

Os estudos relacionando os mecanismos responsáveis pelas mudanças causadas pelo diabetes em seres humanos são limitados, pois além das razões éticas, há um grande número de variáveis não controláveis, tais como comportamento alimentar, nutrição, fatores socioeconômicos e fatores genéticos. Assim, há uma necessidade de modelos experimentais apropriados para a realização de pesquisas (LÓPEZ-SOLDADO & HERRERA, 2003). A utilização de animais para estudos experimentais tem sido crescente, principalmente nos estudos envolvendo drogas, vacinas e investigação de

diagnóstico de doenças. Roedores (ratos e camundongos) têm sido os animais mais utilizados para essas finalidades (BAUMANS, 2004). Porque usar roedores falar dos limites e vantagens

Existem diversos métodos para a indução do diabetes em modelos experimentais, porém a aloxana e a estreptozotocina (STZ) são as substâncias químicas diabetogênicas mais utilizadas. Ambas são drogas citotóxicas seletivas para as células beta pancreáticas, mas agem por vias diferentes para produzir radicais livres que induzem a morte celular (LENZEN, 2008). A aloxana é um derivado de pirimidina que impede a secreção de insulina e provoca o estado diabético pela inibição da glicocinase (sensor de glicose da célula beta), e pela indução da formação de espécies reativas do oxigênio (ROS), que resultam na necrose das células beta pancreáticas. Embora a aloxana possa induzir o diabetes, sua seletividade não tem se mostrado satisfatória, além disso, ela é um componente instável, tem sua dose de efeito próxima a dose letal e por ter grande variabilidade no efeito diabetogênico, leva a uma maior morte de animais e dificulta a indução do diabetes (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008; RADENKOVIĆ *et al.*, 2016).

A indução do diabetes utilizando a STZ pode ser feita de diversas formas, dependendo da dose, via de administração, espécie e a idade do animal utilizado (DAMASCENO *et al.*, 2013a). A STZ é um composto derivado do metabolismo da bactéria *Streptomyces achromogenes* utilizado para induzir o modelo severo do diabetes (glicemia superior à 300 mg/dL) e o quadro moderado (glicemia entre 120 e 300 mg/dL) (DAMASCENO *et al.*, 2013a). Além de destruir as células beta pancreáticas seletivamente, também prejudica a sinalização do metabolismo mitocondrial das células beta, inibindo a secreção de insulina induzida pela glicose. O uso da STZ para provocar o diabetes grave já é bem caracterizado e sua faixa de efeito não é tão estreita como no caso da aloxana (SZKUDELSKI, 2001; WARD *et al.*, 2001; LENZEN, 2008; SAITO *et al.*, 2010).

Para mimetizar as concentrações glicêmicas relacionadas ao DM2 e ao DMG em modelos animais, utiliza-se a indução por STZ em diferentes doses no período neonatal, desenvolvendo na fase adulta uma hiperglicemia de leve à moderada e gerando um quadro de resistência à insulina (PORTHA *et al.*, 1974; SINZATO *et al.*, 2009; SAITO *et al.*, 2010; SINZATO *et al.*, 2012; DAMASCENO *et al.*, 2013a; SANTOS *et al.*, 2015). Apesar dos diversos estudos envolvendo o diabetes moderado, os resultados obtidos são divergentes no que se refere à glicemia, insulina, performance reprodutiva

materna, presença de macrosomia fetal e peso das placentas. Além disso, pouca atenção é dada ao papel de mediadores imunológicos, como citocinas, durante a gestação nos modelos de diabetes induzido experimentalmente.

1.4 Imunologia no diabetes e na gestação

No período gestacional o organismo materno sofre diversas transformações, incluindo o perfil imunológico que precisa se adaptar à presença do feto. O sistema imunológico está em íntimo contato com as células e os tecidos do feto semi-alogênico, que possui 50% do material genético paterno. Desta forma, há mecanismos específicos que modulam o sistema imunológico materno para que não haja rejeição do feto (HVIID, 2006). Alguns mecanismos são sugeridos para que o feto não seja rejeitado, como a separação anatômica do feto, a imaturidade antigênica fetal, a baixa resposta imunológica da mãe e a tolerância imunológica. Os mecanismos para que haja a tolerância ao feto são muitos, podendo agir a distância ou localmente na placenta, e se modificam de acordo com o desenvolvimento embrionário (THELLIN & HEINEN, 2003; AAGAARD-TILLERY *et al.*, 2006).

Na gestação há a participação de células da imunidade inata e adquirida, sendo importantes tanto para o desenvolvimento da gestação quanto para a proteção materna e fetal contra possíveis patógenos (YEH, *et al.*, 2003; MOR & CARDENAS, 2010). Em geral, no período gestacional é comum se observar aumento da contagem de leucócitos, principalmente no número de granulócitos, que é decorrente do aumento dos níveis de estrogênio (BAIN & ENGLAND, 1975; FAAS, *et al.*, 2003). Já na imunidade adaptativa, o papel dos linfócitos é essencial, pois secretam citocinas que serão responsáveis pelo desenvolvimento da gestação (CHAOUAT *et al.*, 2004; ERLEBACHER, 2013).

Durante a gestação, uma elevada quantidade de citocinas e células imunes se encontram na decídua, como os macrófagos, as células *Natural Killer* (NK) e as células T reguladoras (Treg). No primeiro trimestre da gestação, células NK, células dendríticas e macrófagos se acumulam ao redor das células trofoblásticas invasoras e uma elevada concentração de células T helper 1 (Th1) e citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão envolvidos no processo de implantação e placentação. Para garantir todas as mudanças no ambiente uterino, é necessária uma forte resposta inflamatória para ocorrer uma reparação adequada do epitélio do útero e a remoção de

detritos celulares (ASHKAR *et al.*, 2003, DEKEL *et al.*, 2010; MOR & CARDENAS, 2010).

No segundo e início do terceiro trimestre de gestação, a placenta e o feto estão em harmonia, há um crescimento e desenvolvimento rápido do feto e a resposta imunológica predominante é anti-inflamatória (MOR & CARDENAS, 2010). Os linfócitos T helper 2 (Th2) secretam interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) que diminuem a resposta de linfócitos Th1, e conseqüentemente, das citocinas pró-inflamatórias, dessa forma, criam um ambiente favorável para a evolução gestacional (CHATTERJEE *et al.*, 2014). Na última fase da gestação, o feto já está desenvolvido, assim, o parto ocorre por meio de um processo inflamatório, com um influxo de células imunes no miométrio, tendo elevadas concentrações de interleucina 1 (IL-1), IL-6 e TNF- α . O ambiente pró-inflamatório promove a contração do útero, a rejeição da placenta e a expulsão do feto (BOWEN *et al.*, 2002; MOR, 2008).

Durante muito tempo os hormônios produzidos durante a gestação foram considerados os principais responsáveis pelo aumento da resistência à insulina. Entretanto, estudos têm mostrado que as citocinas também podem causar alterações na via da glicose em gestantes (RYAN & ENNS, 1988; ATÈGBO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2013). Os mediadores pró-inflamatórios, como a proteína C-reativa (PCR), TNF- α , IL-6, IL-8 e a leptina são capazes de interferir na sinalização da insulina, podendo contribuir para o aumento da resistência à insulina e levar a alterações no metabolismo da glicose (LAPPAS *et al.*, 2005; ATÈGBO *et al.*, 2006; KUZMICKI *et al.*, 2009).

A relação do TNF- α com a hiperglicemia em mulheres grávidas têm sido amplamente descritas (PANTHAM *et al.*, 2015). Os estudos sugerem que esta citocina, além de inibir a sinalização da insulina, também diminui a expressão de moléculas reguladoras no metabolismo da insulina (MOLLER, 2000; KIM *et al.*, 2001; MORELI *et al.*, 2015). Um estudo de meta-análise associando o DMG e a concentração de TNF- α mostrou que ocorreu uma elevada concentração de TNF- α no soro de mulheres com DMG quando comparadas a gestantes não diabéticas (XU *et al.*, 2014). MORELI *et al.* (2015) também confirmaram aumento de TNF- α no soro de gestantes com DMG, porém a concentração desta citocina foi mais alta em tecidos placentários de gestantes com DM2. A IL-6 também tem sido apontada como um dos agravantes nas gestações complicadas pelo diabetes. Em pessoas não gestantes, essa citocina tem sido associada ao aumento do índice de massa e gordura corporal, como um possível mediador da obesidade crônica e inflamações com resistência à insulina. Foi documentado

concentrações séricas aumentadas de IL-6 durante a gestação e após o parto de mulheres diabéticas (MORISSET *et al.*, 2011).

A IL-10 é considerada um modulador e supressor da resposta imunológica materna para a tolerância do semi-enxerto fetal (THAXTON & SHARMA, 2010). KUZMICKI *et al.* (2008) observaram diminuição na concentração de IL-10 em mulheres com DMG. Por outro lado, foi identificada um aumento sérico de IL-10 em gestações normais quando comparadas às de risco (WU *et al.*, 2001). Em ratas diabéticas prenhes, a IL-10 parece ser responsável pelo desenvolvimento placentário e por mudanças no organismo embrionário e fetal (SINZATO *et al.*, 2011). O aumento de citocinas pró-inflamatórias sem a contra-regulação de IL-10 (para desempenhar um papel na inflamação e no estado de resistência à insulina) pode resultar em diversas disfunções biológicas durante a gravidez (MORELI *et al.*, 2015).

1.5 O uso de plantas medicinais no tratamento do diabete

Para o tratamento do DM1 é indicado o uso de insulina, já para o DM2 são utilizados hipoglicemiantes orais, porém modificações no estilo de vida, incluindo dieta e exercícios físicos têm se mostrado eficiente não só no tratamento da doença, auxiliando na regulação da glicemia, mas também como um mecanismo de prevenção do diabete (FOWLER, 2007; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). Apesar do progresso dos hipoglicemiantes para o tratamento do diabete, ainda existem limitações nas drogas sintéticas para atingir o controle glicêmico perfeito. Assim, buscam-se novas alternativas para tratar o diabete e prevenir suas complicações, e uma delas é o uso de plantas medicinais (DAMASCENO & VOLPATO, 2008; ARUMUGAM *et al.*, 2013).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades vem desde os tempos antigos, tendo seu início empírico, visto que não havia informações suficientes a respeito do poder curativo das plantas. Com o passar dos anos, o uso terapêutico das plantas foi sendo difundido, abandonando o quadro empírico e baseando-se em estudos científicos. O uso de plantas medicinais tem desempenhado um papel essencial na descoberta de novas terapias para doenças, incluindo agentes hipoglicemiantes para o tratamento do diabete, como *Phyllanthus amarus*, *Ocimum sanctum* e *Ficus carica* (VOLPATO *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2006; PETROVSKA, 2012).

Nos países em desenvolvimento, onde a medicina convencional não está totalmente disponível, é comum o uso de plantas medicinais para tratar o diabete e suas

complicações (ARUMUGAM *et al.*, 2013). Algumas plantas utilizadas pela população tiveram o efeito hipoglicemiante e antidiabético confirmado em estudos com seres humanos e animais (DAMASCENO & VOLPATO, 2008). Contudo, embora as plantas medicinais sejam consideradas menos prejudiciais em relação as drogas sintéticas, não se pode validá-las como eficazes e seguras, pois elas não estão livres de toxicidade e efeitos adversos (DE SMET *et al.*, 2004; VOLPATO *et al.*, 2008; ARUMUGAM *et al.*, 2013). Dessa forma, estudos aprofundados são necessários para verificar se os benefícios de sua utilização superam os riscos.

Sabe-se que é comum o uso de plantas medicinais pelas gestantes (ARAÚJO *et al.*, 2016), embora vários cuidados devam ser tomados na sua utilização, pois não existem dados suficientes sobre seus efeitos sobre o organismo materno e fetal (OLIAEE *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016). A atenção deve ser direcionada também para a utilização de plantas conhecidas popularmente como hipoglicemiantes, pois estudos envolvendo o uso de plantas no diabetes e na gestação são escassos, podendo acarretar danos tanto para a mãe quanto para o feto (VOLPATO *et al.*, 2017). Dentre as plantas utilizadas pela população como hipoglicemiante, que ainda não foram testadas no binômio diabetes e prenhez, está a *Morinda citrifolia*.

1.6 Morinda citrifolia

A *M. citrifolia* é um arbusto, pertencente à família das Rubiaceae, sendo conhecida popularmente como “Noni”. É uma planta nativa do sudeste da Ásia, sendo utilizada na medicina tradicional na Polinésia há mais de 2000 anos. É cultivada em diversos lugares como Índia, Polinésia e na América do Sul (SERAFINI *et al.*, 2011). Seus frutos são ovais, possuem um aspecto de relevo e variam sua coloração de verde e amarelo para quase branco, quando amadurecido (Figura 1). Partes da planta como folhas, casca das raízes e principalmente o fruto são consumidos como sucos e utilizados como medicamentos para o tratamento de diversas doenças por comunidades em todo o mundo (MCCLATCHEY *et al.*, 2002; CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).



Figura 1 - Fruto de *M. citrifolia*.

Fonte: Da autora

Em alguns países da Europa, nos Estados Unidos e no Japão há um consumo elevado deste fruto e seus produtos são processados como cápsulas, chás e sucos e comercializados como suplemento alimentar em lojas de alimentos saudáveis, supermercados especializados em alimentos naturais e na internet (EUROPEAN SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2002; CHAN-BLANCO *et al.*, 2006; FRANCHI *et al.*, 2013). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proíbe a comercialização do fruto tanto como medicamento, quanto como alimento, alegando que há falta de comprovação de sua segurança. Segundo o artigo 56 do Decreto-Lei n. 986/69, os produtos com finalidade terapêutica ou medicamentos não são considerados alimentos, dessa forma não há registro de qualquer alimento contendo esse ingrediente na ANVISA (BRASIL, 2007).

O potencial terapêutico da *M. citrifolia* tem sido atribuído a sua variedade de compostos, presentes em todas as partes da planta. Aproximadamente 160 compostos fitoquímicos já foram identificados, sendo encontrados em maior quantidade compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcaloides. Todavia, a composição química difere de acordo com a parte da planta analisada. No seu fruto foi descrito principalmente a presença de flavonoides, lignanas e cumarinas (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006; POTTERAT & HAMBURGER, 2007).

Segundo a medicina tradicional e popular, a *M. citrifolia* tem sido utilizada para o tratamento e prevenção de doenças como artrite, asma, hipertensão, câncer e também para o diabetes (GUPTA & PATEL, 2013; AHMAD *et al.*, 2016). As pesquisas têm relatado alguns efeitos terapêuticos da planta incluindo atividade antimicrobiana (BARANI *et al.*, 2014, BABAJI, *et al.*, 2016), analgésica (WANG *et al.*, 2002), anti-inflamatória (SERAFINI *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2014), anticancerígena (WANG & SU, 2001; FURUSAWA *et al.*, 2003), antioxidante (SERAFINI *et al.*, 2011; RUHOMALLY *et al.*, 2015), hepatoprotetora (NAYAK *et al.*, 2011) e imunomodulatória (HIRAZUMI & FURUSAWA, 1999; WANG *et al.*, 2002; SASMITO *et al.*, 2015).

Grande parte dos estudos realizados em modelos experimentais são feitos com o extrato fermentando do noni, porém, segundo o uso popular, o noni é triturado em liquidificador com água, sendo muitas vezes misturados ao suco de uva, devido ao seu gosto adstringente (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006; BRAMORSKI *et al.*, 2010; NAYAK *et al.*, 2011). Alguns estudos relataram efeito hipoglicemiante do extrato do suco de *M. citrifolia*. NAYAK *et al.* (2011), utilizando extrato fermentado de noni no volume de 2 ml/kg administrado por um período de 20 dias, observaram redução da glicemia em ratos machos *Sprague-Dawley* que receberam STZ na dose de 50mg/kg. LEE *et al.* (2012), utilizando camundongos com DM2 tratados por 90 dias com o pó fermentado de noni (0,4%) misturado na ração, observaram redução da glicemia, hemoglobina glicada (HbA1c) e aumento da sensibilidade à insulina. NERURKAR *et al.* (2012) observaram melhora no metabolismo da glicose em camundongos machos tratados com suco do fruto de *M. citrifolia* fermentado no volume de 1,68 mL/kg durante 12 semanas. NAYAK *et al.* (2007), administrando o suco de frutos de *M. citrifolia* fermentado, via oral (100 ml/kg de peso corporal durante 10 dias) identificaram uma melhora na cicatrização de feridas e uma redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos (modelo de diabetes grave). MAHADEVA & SUBRAMANIAN (2009) administraram oralmente extrato etanólico do fruto (300 mg/kg/dia) durante 30 dias em ratos com diabetes grave, observaram diminuição da glicemia, hemoglobina glicada, ureia e creatinina séricas e aumento de insulina plasmática após o tratamento, sugerindo um efeito anti-hiperglicêmico. Outros estudos também verificaram atividades benéficas da planta no metabolismo da glicose (KAMIYA *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2013; NERURKAR *et al.*, 2015).

Apesar dos efeitos terapêuticos evidenciados pelas pesquisas, ainda há dúvidas sobre a segurança da planta, pois a quantidade de publicações que avaliam sua segurança é limitada (BRASIL, 2007; WEST *et al.*, 2008), principalmente no que se refere ao seu uso na gestação. MÜLLER *et al.* (2009) observaram que o tratamento oral com extrato aquoso de frutos de *M. citrifolia* em ratas, na dose de 7,5 mg/kg do 8º ao 21º dia de prenhez, provocou efeitos adversos no desenvolvimento pré-natal, danos no mecanismo de parto *in vivo* e na contratilidade uterina *in vitro*, porém este efeito não foi observado quando administrado na dose mais alta de 750mg/dL. MARQUES *et al.* (2010) verificaram que o extrato aquoso de frutos de *M. citrifolia* na dose de 7, 30 e 300 mg/kg de peso corporal administrado entre os dias 7 e 15 de prenhez de ratas (período de organogênese) provocou efeitos adversos sobre o desenvolvimento fetal. Ao contrário dos estudos apresentados, WEST *et al.* (2008), administrando o fruto de *M. citrifolia* em ratos *Sprague-Dawley* nas doses de 1,72; 3,43; 6,86 g/kg de peso corporal do dia 0 ao dia 20 de prenhez, não observaram evidências de toxicidade no desenvolvimento embrionário e fetal. WANG *et al.* (2011) também não observaram efeitos adversos sobre a fertilidade e o desenvolvimento fetal em três gerações de descendentes de camundongos que receberam o suco de *M. citrifolia* durante o período de prenhez até o desmame.

Os estudos envolvendo a utilização de *M. citrifolia* no desenvolvimento materno-fetal são controversos. Levando em consideração as propriedades citadas, observa-se a necessidade da exploração científica sobre os potenciais efeitos da utilização dessa planta no binômio diabete e prenhez, com a finalidade de orientar a população sobre seus possíveis efeitos na gestação diabética. Portanto, nossa hipótese é de que a *M. citrifolia* tenha atividade hipoglicemiante, sendo que, seu possível efeito tóxico no organismo materno-fetal seja suplantado pelos benefícios da diminuição da glicemia.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos imunológicos, reprodutivos e fetais do tratamento com extrato aquoso de *M. citrifolia* na prenhez de ratas Wistar em modelo de diabetes de intensidade moderada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar o efeito da *M. citrifolia* sobre o binômio diabetes e prenhez em relação:

- Ao perfil glicêmico materno (glicemia e TOTG);
- Ao leucograma materno completo (contagem total e diferencial);
- Aos efeitos no sistema imunológico por meio da dosagem de citocinas na placenta (IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α);
- Ao desempenho reprodutivo materno;
- Ao desenvolvimento fetal;
- À incidência de anomalias fetais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Obtenção do extrato da planta*

Os frutos de *M. citrifolia* foram coletados na cidade de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil, entre maio e junho de 2015, no período da manhã. A planta foi identificada e autenticada por especialistas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), onde um *espécimes voucher* (09018) foi depositado. Em seguida, os frutos foram lavados e colocados em um processador para facilitar a retirada das sementes. A polpa foi peneirada e armazenada a -20 °C para ser liofilizada. A liofilização foi feita no liofilizador LIOTOP L202[®], sendo realizada em uma sala com temperatura controlada a 17°C. Inicialmente foi necessário ligar o botão frio, e aguardar 30 minutos para o resfriamento do aparelho, em seguida, foi ligada a função vácuo até que o liofilizador atingisse 200 µHg. A polpa foi colocada em frascos com 7,0 cm no adaptador de silicone do aparelho e deixada por 72 horas para secagem. Em seguida o material seco foi triturado em liquidificador e diluído em água sob agitação na proporção de 20 gramas de pó da polpa para cada 400 mL de água durante 30 minutos. Em seguida o extrato foi passado na peneira e uma amostra foi separada para a determinação de sólidos. O extrato foi dividido em alíquotas e armazenado a -20°C até posterior utilização. A determinação de sólidos foi realizada para que se possa calcular a dose em ml que será administrada para cada animal de acordo com seu peso. Ela foi feita pela pesagem de 10 de tubos de polipropileno, adicionado em cada um deles 1 mL de extrato do noni, sendo estes pesados inicialmente e colocado em estufa até sua secagem total, ao final calculou-se o peso seco do extrato pela diferença entre o peso inicial e o peso final do extrato.

3.2 *Animais*

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (Figura 2), em idade reprodutiva, pesando entre 190 e 210 gramas, mantidos no Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FISIOTOX). Os procedimentos e manuseio de animais foram realizados de acordo com as orientações fornecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONSEA) e foram autorizados pelo Comitê de Ética para Animais de Pesquisa da UFMT, Brasil (Protocolo nº 23108.001991/13-1).



Figura 2 - Rato Wistar.

Fonte: Da autora

3.3 Sequência Experimental

3.3.1 Período de adaptação

As ratas foram aclimatadas por 7 dias no biotério do laboratório FISIOTOX do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde no Campus Universitário do Araguaia da UFMT, permanecendo em caixas de polietileno forradas com maravalha, contendo no máximo 4 animais por caixa, sob temperatura ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$) e fotoperíodo (ciclo claro/escuro de 12 horas) controlados. A água e a ração foram oferecidas a vontade. Após este período, as ratas foram colocadas para acasalarem para obtenção dos recém-nascidos.

3.3.2 Período de diabetogênese

O diabetes foi induzido nas fêmeas recém-nascidas no primeiro dia de vida após o nascimento, por administração subcutânea de STZ (SIGMA Chemical Company®, St. Louis, MO), diluída em tampão citrato (0,01M, pH 6,0), na dose de 100 mg/kg de peso corpóreo. As ratas dos grupos não-diabéticos receberam pela mesma via somente o tampão citrato (JAWERBAUM & WHITE, 2010; DAMASCENO *et al.*, 2011; SINZATO *et al.*, 2011). Após a indução, as ratas recém-nascidas continuaram com suas mães (máximo de oito fêmeas = número de tetas funcionais para aleitamento) até o término do período de amamentação (21 dias). Posteriormente, estes animais ficaram sob as mesmas condições estabelecidas no período de adaptação até a padronização pelo critério de inclusão.

3.3.2.1 Critérios de inclusão e de exclusão

Para o grupo não-diabético (controle) - As ratas controle (não-diabéticas) foram submetidas a procedimentos similares às ratas com diabetes moderado com relação às vias de administração, período e volume do veículo. O grupo de ratas não-diabéticas apresentaram teste oral de tolerância à glicose (TOTG) normal (pontos com glicemias inferiores a 140 mg/dL) na vida adulta (110 dias), para que fossem incluídas nos grupos não-diabéticos (SANTOS *et al.*, 2015).

Para o grupo diabetes moderado - Como critério de inclusão, as ratas submetidas à indução do diabetes e que apresentaram TOTG alterado (dois ou mais pontos do teste com glicemia acima de 140 mg/dL tendo limite máximo de 300 mg/dL) na vida adulta (110 dias de vida) foram incluídas no grupo (SANTOS *et al.*, 2015). As demais ratas que não apresentarem TOTG alterado foram excluídas

Para o TOTG, após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa na cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo zero). 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 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, foram determinadas as glicemias. Tais mensurações foram utilizadas para se estimar a área total sob a curva glicêmica, usando matematicamente o método trapezoidal proposto por TAI (1994).

3.3.3 Período de acasalamento

As ratas com 110 dias de vida foram distribuídas quatro a quatro em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha, na presença de um rato macho durante o período da noite. Na manhã subsequente, foi realizado esfregaço vaginal para análise do material citológico em microscopia de luz. A presença de espermatozoides e as características da fase estro do ciclo estral confirmaram o diagnóstico de prenhez e este foi considerado o dia zero de prenhez (VOLPATO *et al.*, 2008). O procedimento para acasalamento teve duração máxima de 15 dias para cada animal e foi realizado até a obtenção do número amostral (n=12 animais/grupo). Em seguida, as ratas prenhes foram sorteadas para comporem os grupos experimentais.

3.3.4 Período de tratamento

As ratas prenhes normoglicêmicas e diabéticas foram posicionadas em caixas individuais para acompanhamento e avaliação dos resultados da prenhez. Em seguida, foram tratadas diariamente no período matutino (entre as 7:00 e 9:00) com água ou extrato da planta. A dose do extrato de *M. citrifolia* foi de 750 mg/Kg de acordo com a

metodologia utilizada por MÜLLER *et al.* (2009). A administração foi feita até o 21º dia de prenhez, por via oral (Figura 3). A glicemia foi avaliada semanalmente, pela manhã, até o final da prenhez. As concentrações da glicemia foram monitoradas por leitura de glicofita (Blood Glucose Monitoring Teste Strips Ultra Johnson & Johnson®, HDI Home Diagnostics, Inc., Flórida). A fita contendo sangue obtido por punção da parte distal da cauda da rata foi introduzida no glicosímetro específico, expressando os valores da glicemia em miligramas por decilitro (mg/dL).

O teste oral de tolerância à glicose foi realizado no 17º de prenhez para avaliação do desenvolvimento de alterações do metabolismo glicêmico. O ganho de peso materno foi calculado pela diferença entre os pesos corpóreos observados nos dias 0 e 21 de prenhez.



Figura 3 – Tratamento, por via oral, com *M. citrifolia*.

Fonte: Da autora

3.4 Grupos Experimentais

As ratas foram distribuídas de maneira aleatória para a composição dos 4 grupos experimentais:

- **Não-diabético:** Ratas prenhes não-diabéticas tratadas com água;
- **Não-diabético Tratado:** Ratas prenhes não-diabéticas tratadas com extrato de *M. citrifolia*;
- **Diabético:** Ratas prenhes com diabetes moderado tratadas com água;

- **Diabético tratado:** Ratas prenhes com diabete moderado tratadas com extrato de *M. citrifolia*.

3.5 Resolução da prenhez e obtenção de dados

Na manhã do 21º dia de prenhez, as ratas de todos os grupos foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax[®]) na dose de 40mg/kg (BRASIL, 2008) e, posteriormente, decapitadas. Em seguida, foi realizada laparotomia com exposição dos cornos uterinos. Os fetos e suas respectivas placentas foram imediatamente retirados e pesados. As placentas foram armazenadas a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

3.5.1 Leucograma

A contagem total das células leucocitárias materna foi adaptada de DANTAS *et al.* (2006) e realizada em câmara de Neubauer, a partir de amostras de sangue diluídas na proporção de 1:20 em líquido de Turck. O material obtido foi homogeneizado e em seguida foi realizada a contagem total de leucócitos em microscopia de luz.

A contagem diferencial das células leucocitárias materna foi realizada em esfregaços de sangue fixados e corados com Panótico (Laborclin[®]) que permite a diferenciação celular. Após a secagem da lâmina foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos em microscópio de luz usando-se objetiva de imersão em óleo (DANTAS *et al.*, 2006).

3.5.2 Extração e quantificação de proteínas

As placentas foram congeladas em nitrogênio e pulverizadas. Foi adicionado nas amostras 500µL de solução tampão e em seguida homogeneizadas em geladeira convencional por 2 horas. Posteriormente, foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e diluído em água destilada.

A curva padrão foi realizada por meio do padrão de BSA (Albumina de soro bovino) e após a pipetagem das amostras foi adicionado Bradford para realizar a quantificação proteica. A leitura foi realizada no leitor de microplaca a 595nm. Para todas as dosagens as amostras foram normalizadas para 1000µg de proteína.

3.5.3 Análises imunológicas

Para a avaliação de citocinas, inicialmente foi realizada a extração e determinada a concentração de proteínas presentes nas placentas. A quantificação de citocinas das amostras foi realizada, seguida por ensaios imunoenzimáticos (expressão de IL-6, IL-10, IFN-γ e TNF-α) de acordo com as especificações do fabricante (BD Bioscience[®]).

O teste consistiu da sensibilização das microplacas de 96 poços com anticorpo de captura, diluído em tampão de revestimento (*coating buffer*), por 12 horas a 4°C. Após a sensibilização lavou-se por cinco vezes a microplaca com tampão de lavagem (*wash buffer*). Foi realizada a etapa de bloqueio com diluente de ensaio (*assay diluent*) contendo albumina do soro bovino (BSA) por 1 hora em temperatura ambiente (23 °C), e lavou-se novamente por cinco vezes a microplaca, conforme descrito acima. As amostras de tecidos foram adicionadas nos seus poços definidos, assim como o padrão da citocina em diluição seriada, e ficaram por 2 horas a temperatura ambiente (23 ± 2°C). Após nova etapa de lavagem, adicionou-se o anticorpo de detecção dissolvido em diluente de ensaio por 1 hora em temperatura ambiente (23 ± 2°C), e lavou-se novamente a microplaca. Após isto, a enzima reagente (estreptavidina peroxidase) foi colocada em diluente de ensaio sendo incubada por 30 minutos em temperatura ambiente (23 ± 2°C), e lavou-se a microplaca sete vezes. Para finalizar, foi adicionado solução de substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) e a reação enzimática foi interrompida após 30 minutos com solução de ácido sulfúrico. A absorbância foi determinada no leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm. A concentração de citocinas foi calculada a partir da interpolação realizada de acordo com a curva padrão.

3.5.4 Desempenho reprodutivo materno

Foram observados e contados os pontos de implantação, reabsorção (morte embrionária) e números de fetos vivos e mortos. Os ovários foram retirados para observação e contagem de corpos lúteos, com auxílio de fotolupa. A porcentagem de perda pré-implantação (taxa de perda de embriões no período que antecede a implantação) foi calculada pela seguinte forma: $[\text{N}^\circ. \text{ de Corpos Lúteos} - \text{N}^\circ. \text{ de Implantações} / \text{N}^\circ. \text{ de Corpos Lúteos}] \times 100$. Também foi calculada a porcentagem de perda pós-implantação (morte dos embriões após a implantação) pela seguinte forma: $[\text{N}^\circ. \text{ de Implantações} - \text{N}^\circ. \text{ de Fetos vivos} / \text{N}^\circ. \text{ de Implantações}] \times 100$ (VOLPATO *et al.*, 2015).

3.5.5 Biomarcadores placentários e fetais

As placentas foram pesadas em balança analítica, livres de membrana e cordão umbilical. A eficiência placentária foi determinada pela razão entre o peso fetal e o peso placentário (MYATT, 2006). Cada feto foi pesado e realizado a classificação dos pesos fetais de acordo com a média ± desvio padrão (DP) dos pesos corporais fetais obtidos

no grupo não-diabético, que definiu três classes diferentes de pesos de recém-nascidos em: AIP - recém-nascidos com peso adequado para idade de prenhez: peso corpóreo compreendido entre a média do peso do grupo não-diabético mais ou menos 1,7 x desvio-padrão; PIP - recém-nascidos pequenos para idade gestacional: peso corpóreo inferior à média de peso do grupo não-diabético menos 1,7 x desvio-padrão; GIP - recém-nascidos grandes para idade gestacional: peso corpóreo superior à média do peso de grupo não-diabético mais 1,7 x desvio-padrão (DAMASCENO *et al.*, 2013b).

3.5.6 *Análise das malformações externas*

Após a pesagem dos fetos, foi realizada a análise das malformações externas. Os recém-nascidos foram examinados externamente, com análise minuciosa de olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda (DAMASCENO *et al.*, 2008).

3.5.7 *Análise das anomalias viscerais*

Aleatoriamente, metade dos recém-nascidos de cada ninhada foi colocada em solução de Bodian para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos. Completada a fixação, foi utilizado o método de secção seriada proposto por WILSON (1965), para observação de anomalias viscerais.

3.5.8 *Análise das anomalias esqueléticas e contagem dos pontos de ossificação*

A outra metade dos recém-nascidos de cada ninhada foi colocada em álcool (70%) e, após 24 horas, foram eviscerados, diafanizados com hidróxido de potássio e corados com alizarina (Figura 4). Para análise das anomalias esqueléticas foi utilizado o método de STAPLES & SCHNELL (1964). Os centros de ossificação foram contados e analisados usando parâmetros propostos por ALIVERTI *et al.* (1979).

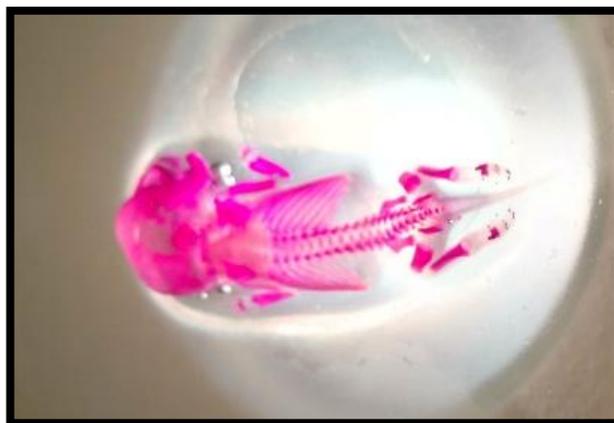


Figura 4 - Análise de anomalias esqueléticas.

Fonte: Da autora

3.6 Análises estatísticas

Após passarem pelo teste de normalidade, os resultados encontrados foram estatisticamente analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey para valores médios. Para a comparação das porcentagens foi utilizado o teste Exato de Fisher. Para valores analisados dentro do grupo (2x2) foi utilizado teste t de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A glicemia materna das ratas do grupo Não-diabético Tratado não apresentou diferença estatística em qualquer momento da prenhez em relação ao grupo Não-diabético. Por outro lado, as ratas dos grupos diabéticos apresentaram glicemia superior ao grupo Não-diabético no dia 0 de prenhez. Adicionalmente, o grupo Diabético Tratado apresentou aumento da glicemia em relação aos grupos não-diabéticos no dia 14 de prenhez (Figura 5).

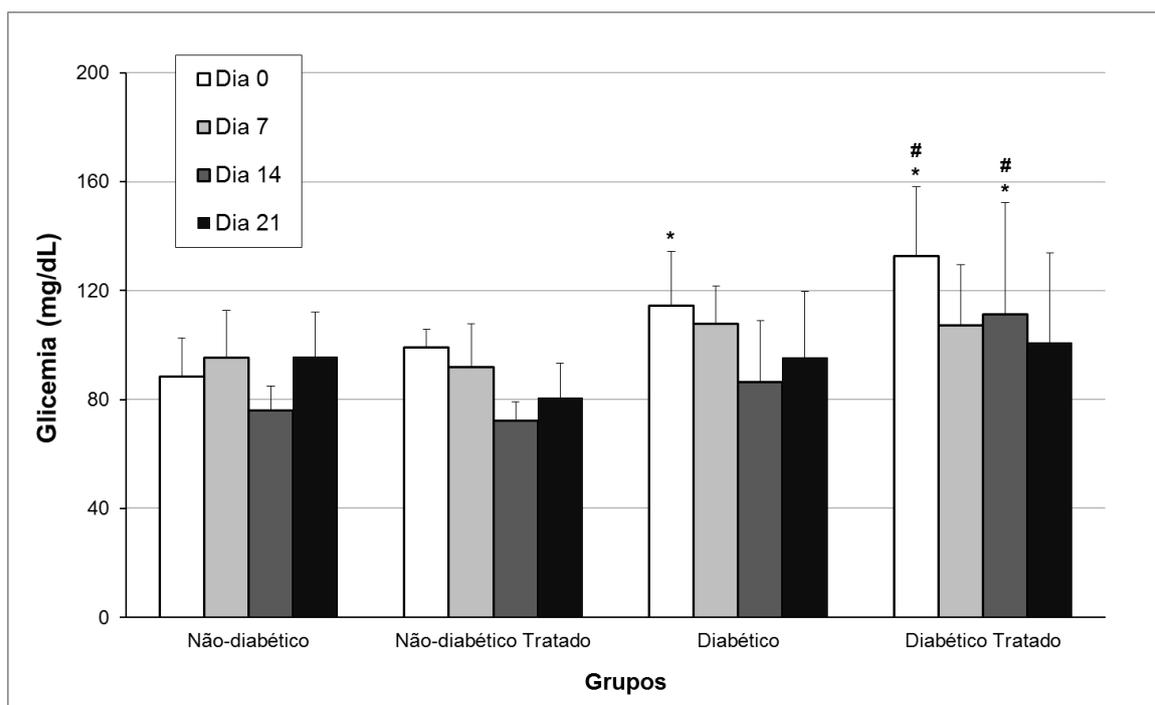


Figura 5: Médias e respectivos desvio-padrão da glicemia (mg/dL) de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com o extrato aquoso de *M. citrifolia* ou água.

* $p < 0,05$ - Diferente do Grupo Não-diabético (ANOVA seguida de teste de Tukey).

$p < 0,05$ - Diferente do Grupo Não-diabético Tratado (ANOVA seguida de teste de Tukey).

A Figura 6 apresenta os resultados da área sob a curva (ASC) do teste oral de tolerância a glicose realizados no dia zero e 17 de prenhez. Não houve diferença estatística entre os grupos não-diabéticos, porém ambos os grupos apresentaram redução da ASC no 17º dia de prenhez, assim como os grupos diabéticos. Os grupos diabéticos apresentaram ASC aumentada comparados aos animais não-diabéticos.

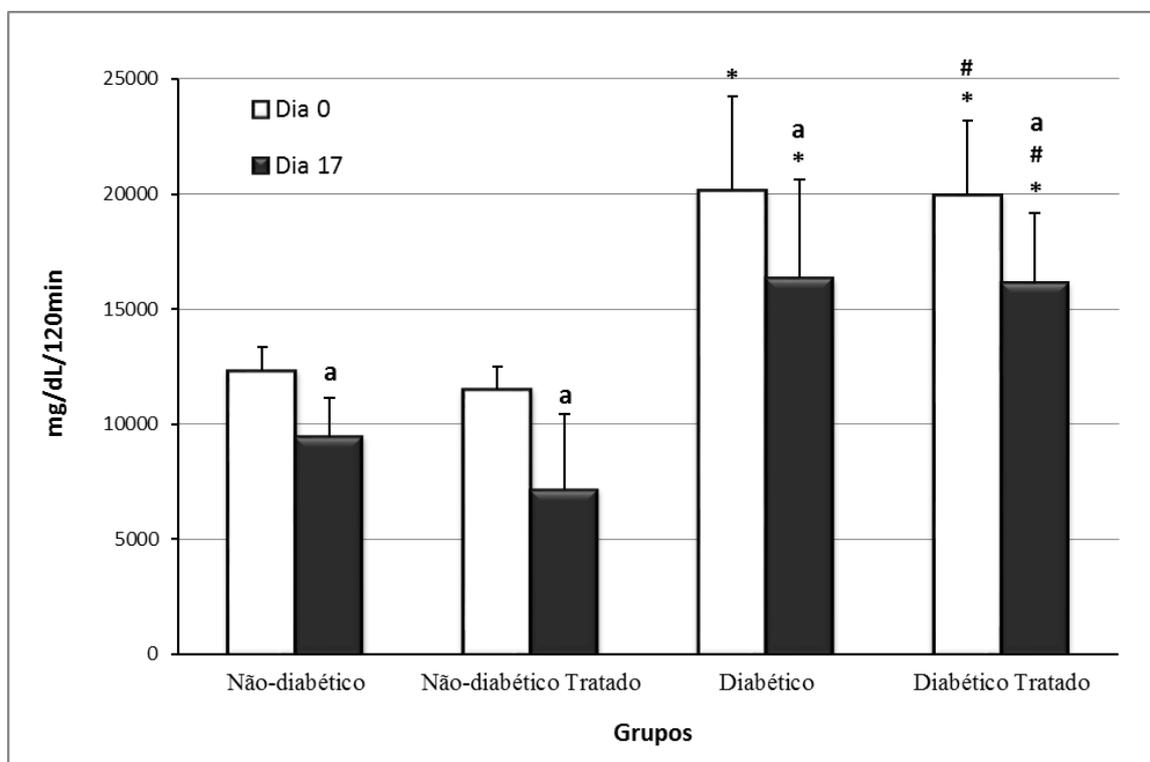


Figura 6: Médias desvio-padrão da área sob a curva (mg/dL/120min) do teste oral de tolerância a glicose de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com o extrato aquoso de *M. citrifolia* ou água.

* $p < 0,05$ - Diferente do Grupo Não-diabético (ANOVA seguida de teste de Tukey).

$p < 0,05$ - Diferente do Grupo Não-diabético Tratado (ANOVA seguida de teste de Tukey).

^a $p < 0,05$ - Diferente do dia 0 (teste *t* de Student).

A Tabela 1 mostra o perfil leucocitário analisado neste estudo. Os grupos experimentais apresentaram parâmetros semelhantes entre si em relação ao leucograma completo.

Tabela 1. Médias e respectivos desvio-padrão do leucograma completo de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas ou não com *M. citrifolia* durante a prenhez.

	Grupos			
	Não-diabético	Não-diabético Tratado	Diabético	Diabético Tratado
N	13	12	13	15
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$5,40 \pm 1,60$	$6,15 \pm 1,44$	$6,35 \pm 1,74$	$5,48 \pm 1,53$
Segmentados ($10^3/\text{mm}^3$)	$1,95 \pm 0,54$ (30 - 43%)	$2,45 \pm 0,76$ (32 - 46%)	$1,96 \pm 0,85$ (22 - 40%)	$2,23 \pm 0,98$ (30 - 48%)
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	$0,04 \pm 0,03$ (0 - 1%)	$0,06 \pm 0,04$ (0 - 1%)	$0,07 \pm 0,08$ (0 - 2%)	$0,02 \pm 0,03$ (0 - 1%)
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$3,23 \pm 1,15$ (47 - 67 %)	$3,41 \pm 0,92$ (48 - 62%)	$4,08 \pm 1,20$ (57 - 73%)	$3,11 \pm 0,75$ (48 - 66%)
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$0,18 \pm 0,09$ (2 - 5%)	$0,23 \pm 0,11$ (2 - 5%)	$0,15 \pm 0,07$ (1 - 3%)	$0,12 \pm 0,06$ (1 - 3%)

N= número amostral

$p > 0,05$ – ANOVA seguida de teste de Tukey.

A Tabela 2 mostra as concentrações de citocinas placentárias. O grupo Não-diabético Tratado apresentou uma diminuição nas concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ e TNF- α comparadas ao grupo Não-diabético. No grupo Diabético Tratado foi observado um aumento nas concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-10 em relação ao grupo Não-diabético Tratado.

Tabela 2. Média e respectivos desvio-padrão de citocinas placentárias de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas ou não com *M. citrifolia* durante a prenhez.

	Grupos			
	Não-diabético	Não-diabético Tratado	Diabético	Diabético Tratado
N	7	7	7	7
IL-6 (pg/ml)	837,1 \pm 397,2	318,0 \pm 82,6*	527,9 \pm 242,7	691,7 \pm 105,7
IFN- γ (pg/ml)	929,9 \pm 245,4	279,5 \pm 164,5*	711,8 \pm 229,4	735,2 \pm 231,7#
TNF- α (pg/ml)	1284,3 \pm 303,8	640,4 \pm 255,0*	1037,1 \pm 253,7	1085,1 \pm 310,5#
IL-10 (pg/ml)	778,4 \pm 280,1	423,4 \pm 161,2	844,1 \pm 247,6	942,9 \pm 345,0#

N = número amostral

**p* < 0,05 - Diferente do Grupo Não-diabético (ANOVA seguida de teste de Tukey)

#*p* < 0,05 - Diferente do Grupo Não-diabético Tratado (ANOVA seguida de teste de Tukey)

A Tabela 3 apresenta o desempenho reprodutivo materno. Os animais do grupo Não-diabético Tratado apresentaram diminuição no ganho de peso materno e no número de implantações e aumento significativo nas taxas de perda pré-implantação em relação ao grupo Não-diabético. O grupo Diabético Tratado também apresentou aumento nas taxas de perda pré-implantação comparado ao grupo Não-diabético.

Tabela 3. Desempenho reprodutivo de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas ou não com *M. citrifolia* durante a prenhez

	Grupos			
	Não-diabético	Não-diabético Tratado	Diabético	Diabético Tratado
Prenhez a termo (N)	13	12	13	15
Corpo lúteo ^a				
Total (N)	162	140	157	175
Média ± DP	12,5 ± 1,0	11,7 ± 2,6	12,1 ± 1,5	11,6 ± 1,3
Implantações ^a				
Total (N)	150	113	135	146
Média ± DP	11,5 ± 1,1	9,4 ± 2,0*	10,4 ± 1,8	9,6 ± 2,6*
Fetos vivos ^a				
Total (N)	136	101	123	133
Média ± DP	10,5 ± 1,3	8,4 ± 2,0	9,5 ± 2,2	8,9 ± 2,8
Fetos mortos ^a				
Total (N)	1	0	0	0
Média ± DP	0,07 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0
Reabsorções ^a				
Total (N)	13	12	12	13
Média ± DP	1,0 ± 1,3	1,0 ± 1,1	0,9 ± 0,9	0,9 ± 1,2
Proporção sexual (M/F) ^b	72/64	58/43	67/56	54/79
Perda Pré-implantação (%) ^b	7,41	23,89*	14,01	16,57*
Perda Pós-implantação (%) ^b	9,33	10,62	8,88	8,90
Ganho de peso materno (g) ^a	114,1 ± 12,4	91,0 ± 12,9*	106,5 ± 9,4	99,9 ± 19,7
Peso do útero gravídico (g) ^a	74,6 ± 10,1	61,17 ± 14,0	65,8 ± 13,8	63,0 ± 18,7
Ganho de peso materno menos peso do útero gravídico (g) ^a	39,5 ± 9,7	29,8 ± 12,5	40,8 ± 13,1	36,8 ± 8,3

N= número. Dados mostrados como média ± desvio padrão (DP) e proporções (%). ^a ANOVA seguido de teste de Tukey; ^b Teste Exato de Fisher.

* $p < 0,05$ - Diferente do Grupo Não-diabético

A Tabela 4 é referente ao peso e classificação fetal, peso placentário e eficiência placentária. Não foi observada diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados.

Tabela 4. Peso e classificação fetal, peso placentário e eficiência placentária de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas ou não com *M. citrifolia* durante a prenhez.

	Grupos			
	Não-diabético	Não-diabético Tratado	Diabético	Diabético Tratado
N	13	12	13	15
Peso fetal (g) ^a	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,6	5,4 ± 0,4	5,3 ± 0,6
Fetos PIP (%) ^b	5,2	10,9	8,1	7,5
Fetos AIP (%) ^b	90,4	83,2	85,5	85,0
Fetos GIP (%) ^b	4,4	5,9	2,4	7,5
Peso placentário (g) ^a	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Eficiência placentária (x1000) ^a	11,2 ± 1,6	11,5 ± 2,1	11,3 ± 1,7	11,2 ± 2,2

N= número amostral

Dados mostrados como média ± desvio padrão (DP) e proporções (%). ^a ANOVA seguido de teste de Tukey; ^b Teste Exato de Fisher.

$p > 0,05$

A Tabela 5 mostra os sítios de ossificações fetais. Não houve diferença entre grupos experimentais em relação aos sítios de ossificação.

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos sítios de ossificação de fetos de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas ou não com *M. citrifolia* durante a prenhez.

	Grupos			
	Não-diabético	Não-diabético Tratado	Diabético	Diabético Tratado
N	13	12	13	15
Falanges Anteriores	3,7 ± 0,6	3,4 ± 0,5	3,6 ± 0,6	3,6 ± 0,7
Metacarpos	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	3,97 ± 0,1
Falanges Posteriores	2,4 ± 0,9	2,0 ± 1,1	2,1 ± 0,9	2,4 ± 1,1
Metatarsos	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,0	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,1
Vértebras Caudais	4,7 ± 0,8	4,0 ± 0,5	4,7 ± 1,2	4,1 ± 0,6
Esternébrios	5,9 ± 0,1	5,9 ± 0,1	6,0 ± 0,0	5,9 ± 0,1
Total	25,7 ± 1,9	24,5 ± 2,0	25,33 ± 2,4	25,0 ± 2,3

N = número amostral

$p > 0,05$ – ANOVA seguida de teste de Tukey.

Na Figura 7 observa-se as frequências de anomalias fetais esqueléticas e viscerais. O grupo Não-diabético Tratado apresentou um aumento de anomalias viscerais e uma diminuição de fetos com morfologia normal em relação ao grupo Não-diabético. Os grupos diabéticos mostraram um aumento de anomalias viscerais comparados ao grupo Não-diabético. Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação às anomalias esqueléticas.

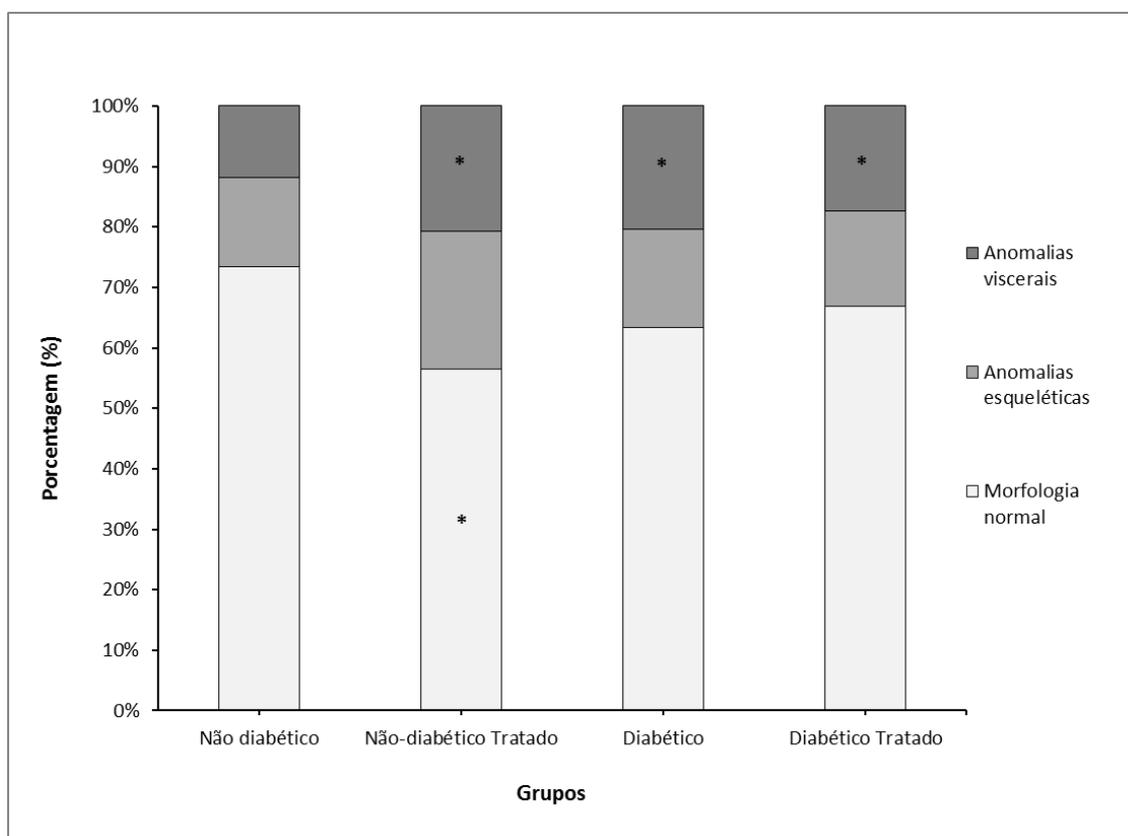


Figura 7: Frequência de anomalias fetais de ratas não-diabéticas e diabéticas tratadas com o extrato aquoso de *M. citrifolia* ou água.

* $p < 0,05$ - Diferente do Grupo Não-diabético (Teste Exato de Fisher).

5. DISCUSSÃO

O tratamento com *M. citrifolia* durante a prenhez de animais não-diabéticos diminuiu a concentração de citocinas placentárias inflamatórias e o número de implantações, resultando em um aumento nas taxas de perda pré-implantação. Além disso, o tratamento resultou em aumento de fetos com anomalias viscerais. Nos animais diabéticos tratados também foi observado aumento nas taxas de perda pré-implantação. Entretanto, o tratamento com a planta não foi capaz de alterar parâmetros glicêmicos nesses animais.

Os modelos experimentais de diabetes são fundamentais para o esclarecimento de suas complicações, e diversos grupos de pesquisa têm se empenhado em reproduzir modelos de diabetes que se assemelhem com os tipos de DM em humanos. Desta forma, o diabetes moderado é utilizado em estudos experimentais para mimetizar a glicemia materna encontrada na gestação diabética humana (DAMASCENO *et al.*, 2013b). Os primeiros relatos da indução do diabetes moderado em modelo animal surgiram em 1974, utilizando a STZ administrada no período neonatal. Apesar da citotoxicidade específica da STZ pelas células β pancreáticas, quando administrada nos primeiros dias de vida do animal, pode ocorrer regeneração parcial dessas células em um momento posterior (PORTHA *et al.*, 1974; DAMASCENO *et al.*, 2013b). A recuperação celular após a administração da droga é dependente do tempo e da gravidade inicial do diabetes induzido (PORTHA *et al.*, 1974).

No presente estudo, os animais dos grupos diabéticos apresentaram nível glicêmico superior comparado ao grupo Não-diabético, no início da prenhez, confirmando seu estado diabético. O grupo Diabético, ao longo da prenhez, teve uma redução na sua glicemia, sendo resultados próximos aos grupos não-diabéticos. Outros estudos também mostraram que neste modelo experimental de diabetes, os animais normalmente não apresentam glicemia alterada na vida adulta, mas sim alterações no teste oral de tolerância à glicose (TOTG), sendo este modelo caracterizado por picos hiperglicêmicos frente à sobrecarga de glicose (IESSI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015). O grupo Não-diabético Tratado não mostrou alteração nas concentrações glicêmicas, demonstrando que somente a planta não é suficiente para alterar o metabolismo da glicose, porém quando o tratamento é realizado no estado diabético há um aumento da glicemia, como observado no dia 14 de prenhez, sugerindo que a associação entre a *M. citrifolia* e o estado glicêmico alterado, pode intensificar o quadro

de hiperglicemia na gestação. Este trabalho não corrobora com outros estudos, em que foram observados atividade hipoglicemiante do fruto (NAYAK *et al.*, 2007; MAHADEVA & SUBRAMANIAN, 2009; NAYAK *et al.*, 2011; NERURKAR *et al.* 2012; LEE *et al.*, 2012; NERURKAR *et al.*, 2015). Contudo, o tipo de indução do diabete, a espécie do animal, a origem da planta, a dose, o tempo de tratamento e a preparação do extrato foram realizados de modos diferentes a estes estudos. Além disso, neste trabalho o tratamento foi realizado durante a prenhez de ratas. No período de gestação há uma complexa adaptação endócrina-metabólica no organismo materno para proporcionar o crescimento fetal, aumentando de forma moderada a glicose no sangue e diminuindo a sensibilidade à insulina que afeta a disponibilidade e o destino de nutrientes tanto na mãe como no feto (DI CIANNI *et al.*, 2003; MUSIAL *et al.*, 2016).

Os grupos diabéticos apresentaram ASC superior ao grupo Não-diabético no dia zero, comprovando a eficácia do modelo de diabete moderado empregado, no qual se observa dificuldade na captação de glicose pelos tecidos quando é administrada uma sobrecarga de glicose, gerando um quadro de intolerância à glicose (IESSI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015). Não foi observado diminuição da ASC no grupo Diabético Tratado mostrando que a planta não foi capaz de reduzir o quadro de intolerância à glicose, sendo ineficaz sua ação sobre o metabolismo glicêmico na prenhez diabética. Todos os grupos apresentaram uma redução da tolerância a glicose no dia 17 de prenhez em relação ao dia zero. Esse período é caracterizado pelo início do crescimento máximo fetal, assim, o feto necessita de mais glicose materna para seu desenvolvimento, diminuindo a sensibilidade à insulina materna (BUCHANAN & XIANG, 2005; JOHNSEN *et al.*, 2008; KEELY, 2014).

A contagem total e diferencial de leucócitos são parâmetros importante que podem refletir a situação inflamatória de todo o organismo. Os leucócitos podem ser ativados por produtos de glicação, estresse oxidativo e angiotensina II, que são estimulados pela hiperglicemia. Os estudos clínicos e epidemiológicos mostraram que a leucocitose é um preditor de resistência à insulina, diabete tipo 2 e síndrome metabólica (CHUNG *et al.*, 2005; MORADI *et al.*, 2012). MORADI *et al.* (2012) relataram que pacientes com idade mais avançada, que portanto, possuem o diabete por mais tempo, apresentam aumento na contagem de leucócitos. Neste estudo não foi observado nos grupos diabéticos diferença estatística no perfil leucocitário. Provavelmente, o modelo de diabete moderado utilizado não levou a um quadro de hiperglicemia que alterasse as taxas leucocitárias. No presente trabalho não houve diferenças significativas na

contagem total ou diferencial de leucócitos no tratamento com a planta. WEST *et al.* (2009) observaram pacientes que ingeriram 30 mL, 300 mL e 750 mL do suco do fruto de *M. citrifolia* por quatro semanas, e também não foram observadas alterações no perfil leucocitário.

Durante a gestação, o sistema imunológico materno precisa se manter em equilíbrio e adaptar à presença fetal. As alterações neste equilíbrio podem resultar em quebra das defesas imunitárias contra patógenos, ou diminuir a tolerância fetal, gerando problemas no processo de implantação, aborto espontâneo, parto prematuro e restrição do crescimento intra-uterino (MARTÍNEZ-VAREA *et al.*, 2014; PUDNEY *et al.*, 2016). A placenta é um órgão altamente especializado, composto por células maternas e fetais e tem uma importante função no desenvolvimento fetal no período da gestação. Ela permite a troca de nutrientes e de gases, eliminação de resíduos, além de apresentar uma grande importância na defesa imunológica para o feto contra a rejeição materna. A placenta desde o início do desenvolvimento fetal contribui para aumentar citocinas e moléculas inflamatórias em nível local e sistêmico (HAUGUEL, 2006). Neste trabalho, o grupo Não-diabético Tratado apresentou diminuição nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ e TNF- α comparado ao grupo Não-diabético. CHANG *et al.* (2013) também observaram diminuição de TNF- α em camundongos machos tratados com suco do fruto de *M. citrifolia* por um período de quatro semanas. Um efeito anti-inflamatório também foi observado por YU *et al.* (2008), que verificaram que a escopoletina e quercetina, substâncias presentes no fruto do noni, possuem efeito anti-inflamatório, inibindo PGE2 (prostaglandina E2), IL1 β (interleucina 1 beta) e IL-6 em modelo de edema em orelha de camundongo. Em gestações complicadas pelo diabete, a placenta sofre uma variedade de mudanças estruturais e funcionais, que estão diretamente relacionadas ao nível de hiperglicemia intrauterino. Esse metabolismo materno anormal pode estimular células placentárias, resultando no aumento da produção de citocinas. Os estudos mostraram que em estados de resistência à insulina pode haver um aumento nas concentrações de mediadores imunológicos, tais como TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- γ . (DANDONA *et al.*, 2004; ATÈGBO *et al.*; 2006; DESOYE & MOUZON, 2007). SINZATO *et al.* (2011) utilizando o modelo de diabete moderado não observaram alterações séricas na concentração de TNF- α , porém houve uma diminuição de IL-10 nas ratas diabéticas prenhes. Em nosso estudo não foi observado diferenças nas concentrações de citocinas placentárias no grupo Diabético. As concentrações de citocinas placentárias e séricas podem diferir, pois a transferência

transplacentária de citocinas da mãe para o feto é mínima, dessa forma a origem das citocinas encontradas na circulação fetal ou é liberada pela própria placenta ou sintetizada dentro do feto (ZARETSKY *et al.*, 2004; AALTONEN *et al.*, 2005; DESOYE & MOUZON, 2007). Foi observado no grupo Diabético Tratado um aumento nas concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-10 em relação ao grupo Não-diabético Tratado. Sugere-se que a planta frente ao estado hiperglicêmico intensifique a produção de citocinas, tendo ação diferente à encontrada em organismos normais. A ação de uma substância é dependente do funcionamento normal de órgãos que participam de sua farmacocinética. Uma patologia pode perturbar não apenas a contribuição de determinado órgão para a ação da droga, mas modificar a ação farmacológica da substância, por exemplo, influenciando o número de receptores e sua capacidade de resposta (WILSON & BROMBERG, 1980; TURNER, 1984)

Para o sucesso da gestação, é necessário que durante o processo de implantação ocorra processos fisiológicos e moleculares altamente organizados. Em roedores, o período de implantação é limitado, sendo que o blastocisto precisa interagir de forma adequada ao estado receptivo do útero. Se os processos não ocorrerem de forma ordenada, a implantação poderá falhar ou ser defeituosa, neste último caso, poderá ocorrer efeitos adversos durante a prenhez. Devido a questões éticas e a falta de estudos mecanicistas sobre interações embrionárias e uterinas em humanos, a utilização de animais tem auxiliando na ampliação do conhecimento nos processos de implantação e decidualização (CHA *et al.*, 2012). A taxa de implantação está relacionada com o número de corpos lúteos, sendo de extrema importância para o sucesso de implantação do blastocisto no endométrio (FORD, 1982; SANTOS *et al.*, 2016). Nos grupos tratados foram observados aumento nas taxas de perda pré-implantação em relação ao grupo não-diabético, sendo consequência da diminuição no número implantações. HORNICK *et al.* (2003) verificaram atividade antiangiogênica do suco da *M. citrifolia*, que inibiu o crescimento inicial de novos vasos da placenta. Aliado a isto, a atividade inibidora seletiva da COX-2 pelo Noni foi demonstrada por SU *et al.* (2001), sendo a COX-2 indispensável para o processo de implantação e decidualização (SALLEH, 2014). Esses fatores sugerem que o fruto da *M. citrifolia* possa prejudicar o processo de implantação. As perdas pós-implantação representam a perda reprodutiva total durante a gestação (SANTOS *et al.*, 2016). A quantidade de embriões implantados depende do número de ovócitos maduros liberados na ovulação, fertilização e do processo adequado de implantação (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996). O

tratamento com *M. citrifolia* não causou perdas embrionárias após o processo de implantação. MÜLLER *et al.* (2009), utilizando a mesma dose de suco de *M. citrifolia* em ratas prenhes, também não observaram alterações nas perdas pós-implantação.

Durante a gestação, devido ao crescimento fetal e as adaptações no organismo materno, é comum o aumento progressivo do peso durante a gravidez, sendo este um fator importante para a saúde materna e fetal (IESSI *et al.*, 2010; MONTE *et al.*, 2011). No entanto, o ganho de peso materno no grupo Não-diabético Tratado foi menor comparado ao grupo Não-diabético. Os estudos realizados com o extrato do fruto de *M. citrifolia in vitro* verificaram sua capacidade de inibir a lipoproteína lipase, que é responsável por catalisar a hidrólise de triglicerídeos no sangue, sendo que sua inibição reduz a absorção de ácidos graxos livres e pode ocasionar a diminuição do ganho de peso (SAHIB *et al.*, 2011; SAHIB *et al.*, 2012). Além disso, neste grupo houve aumento das perdas embrionárias antes do processo de implantação, o que também pode ter contribuído para o ganho de peso materno diminuído.

A eficiência placentária é um parâmetro utilizado para verificar a função da placenta em relação às trocas materno-fetais, sendo um importante determinante do crescimento intrauterino (FOWDEN *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2015). Dessa forma, a capacidade de transferência de nutrientes da placenta depende do seu correto funcionamento, estando relacionado com sua morfologia, tamanho, fluxo sanguíneo adequado e síntese de hormônios essenciais para a manutenção da gestação. Alterações em qualquer um desses fatores pode afetar o crescimento intrauterino (FOWDEN & FORHEAD, 2004; FOWDEN *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007). Neste estudo não foi observada diferença estatística entre os grupos no peso fetal e no peso placentário, conseqüentemente não houve alterações na eficiência placentária e na classificação fetal.

A avaliação dos sítios de ossificação é um parâmetro importante nos estudos de embriotoxicidade e determina o grau de desenvolvimento fetal (ALIVERTI *et al.*, 1979). SAITO *et al.* (2010) observaram diminuição dos sítios de ossificação em fetos de ratas prenhez com diabetes moderado. Por outro lado, IESSI *et al.* (2010) não observaram alteração nos sítios de ossificação de fetos provenientes de mães com diabetes moderado, corroborando com este trabalho, em que também não foi observada imaturidade somática no desenvolvimento fetal em nenhum dos grupos experimentais.

O período de desenvolvimento embrionário é muito sensível, podendo ser afetado por diversas substâncias químicas. O grupo Não-diabético Tratado apresentou diminuição de fetos com morfologia normal e aumento de anomalias viscerais em

relação ao grupo Não-diabético, sugerindo que a planta possa prejudicar o desenvolvimento fetal intrauterino, ocasionando anomalias viscerais. A *M. citrifolia* possui a atividade inibidora seletiva da COX-2 (SU *et al.*, 2001), sendo que a exposição pré-natal a drogas capazes de inibir a COX pode ocasionar danos fetais como retardo no crescimento intrauterino e embriotoxicidade, porém os mecanismos ainda não foram estabelecidos (BURDAN *et al.*, 2007). Nos grupos Diabéticos também foram observados aumento de anomalias viscerais. SINZATO *et al.* (2011) relataram que o ambiente hiperglicêmico materno pode ocasionar alterações metabólicas, como o aumento do estresse oxidativo, contribuindo para o aumento de anomalias viscerais. Outros estudos também relataram o aumento de anomalias viscerais na prenhez complicada pelo diabetes, mas com hiperglicemia elevada (DAMASCENO *et al.*, 2002; VOLPATO *et al.*, 2008).

Os trabalhos que visam avaliar o efeito hipoglicemiante de plantas utilizadas pela população para o tratamento do diabetes são de extrema importância, principalmente se seu uso for durante a gestação, pois as plantas não estão livres de efeitos adversos, podendo causar danos ao organismo materno e fetal. Segundo Volpato *et al.* (2017), embora a população faça uso de plantas medicinais para o tratamento do diabetes durante a gestação, há poucos trabalhos na literatura que avaliam a eficácia e a segurança dessas plantas. O tratamento com *M. citrifolia* foi prejudicial para a gestação, demonstrando que o uso de plantas medicinais, sem estudos científicos que comprovem sua segurança e eficácia pode ser potencialmente perigoso.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com *M. citrifolia* durante a prenhez de animais diabéticos não mostrou melhoras no metabolismo glicêmico, mas causou aumento de perda pré-implantação. Nos animais não-diabéticos apresentou alterações maternas, especialmente no perfil de citocinas, diminuindo a concentração de IL-6, IFN- γ e TNF- α , além de aumentar as perdas embrionárias e as anomalias viscerais. Portanto, o tratamento com o extrato aquoso de *M. citrifolia* pode ser prejudicial para a gestação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGAARD-TILLERY, K. M.; SILVER, R.; DALTON, J. Immunology of normal pregnancy. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, p. 279-295, 2006.
- AALTONEN, R.; HEIKKINEN, T.; HAKALA, K.; LAINE, K.; ALANEN, A. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. **Obstetrics & Gynecology**, v. 106, n. 4, p. 802-807, 2005.
- AERTS, L.; VAN ASSCHE, F. A. Intra-uterine transmission of disease. **Placenta**, v. 24, p. 905- 911, 2003.
- AHMAD, A. N.; DAUD, Z. A. M.; ISMAIL, A. Review on potential therapeutic effect of *Morinda citrifolia* L. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 62-67, 2016.
- AL GHAFI, M. H. M.; PADMANABHAN, R.; KATAYA, H. H.; BERG, B. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on maternal diabetes induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 261, p. 123-135, 2004.
- ALIVERTI, V.; BONANOMI, L.; GIAVINI, E. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, p. 237-242, 1979.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.39, p. S13-S22, 2016.
- ARAÚJO, C. R.; SANTIAGO, F. G.; PEIXOTO, M. I.; OLIVEIRA, J. O.; COUTINHO, M. Use of Medicinal Plants with Teratogenic and Abortive Effects by Pregnant Women in a City in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 38, n. 3, p. 127-131, 2016.
- ARUMUGAM, G.; MANJULA, P.; PAARI, N. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 3, p. 196-200, 2013.
- ASHKAR, A. A.; BLACK, G. P.; WEI, Q.; HE, H.; LIANG, L.; HEAD, J. R.; CROY, B.A. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 6, p. 2937-2942, 2003.
- ATÈGBO, J. M.; GRISSA, O.; YESSOUFOU, A.; HICHAMI, A.; DRAMANE, K. L.; MOUTAIROU, K.; MILED, A.; GRISSA, A.; JERBI, M.; TABKA, Z.; KHAN,

- N. A. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4137-4143, 2006.
- BABAJI, P.; JAGTAP, K.; LAU, H.; BANSAL, N.; THAJURAJ, S.; SONDHI, P. Comparative evaluation of antimicrobial effect of herbal root canal irrigants (*Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica*, *Aloe vera*) with sodium hypochlorite: An in vitro study. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 6, n. 3, p. 196-199, 2016.
- BAIN, BARBARA J.; ENGLAND, J. M. Variations in leucocyte count during menstrual cycle. **British medical journal**, v. 2, n. 5969, p. 473-475, 1975.
- BARANI, K.; MANIPAL, S.; PRABU, D.; AHMED, A.; ADUSUMILLI, P.; JEEVIKA, C. Anti-fungal activity of *Morinda citrifolia* (noni) extracts against *Candida albicans*: An in vitro study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 25, n. 2, p. 188-190, 2014.
- BAUMANS, V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? **Gene therapy**, v. 11, p. S64-S66, 2004.
- BLUE, E. K.; SHEEHAN, B. M.; NUSS, Z.V.; BOYLE, F.A.; HOCUTT, C. M.; GOHN, C.R.; VARBERG, K. M.; MCCLINTICK, J.N.; HANELINE, L. S. Epigenetic Regulation of placenta-specific 8 contributes to altered function of endothelial colony-forming cells exposed to intrauterine gestational *Diabetes Mellitus*. **Diabetes**, v. 64, p. 2664–2675, 2015.
- BOWEN, J. M.; CHAMLEY, L.; MITCHELL, M. D.; KEELAN, J. A. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. **Placenta**, v. 23, n. 4, p. 239-256, 2002.
- BRAMORSKI, A., CHEREM, A. D. R., MARMENTINI, C. P., TORRESANI, J., MEZADRI, T., & COSTA, A. D. A. S. Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and its components. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 651-656, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Informe técnico nº 25, de 29 de maio de 2007. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda citrifolia*, também conhecida como do suco de noni. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/-informes/25_290507.htm. Acesso em: 06 de setembro de 2016.

- BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Manual de utilização de animais/fiocruz. 1. ed. COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO – CEUA: Rio de Janeiro, 2008. p. 1-54.
- BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 485-491, 2005.
- BURDAN, F.; ROZYLO-KALINOWSKA, I.; SZUMILO, J.; DUDKA, J.; KLEPACZ, R. Cyclooxygenase inhibitors affect bone mineralization in rat fetuses. **Cells Tissues Organs**, v. 187, n. 3, p. 221-232, 2007.
- CHA, JEEYEON; SUN, XIAOFEI; DEY, SUDHANSU K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 12, p. 1754-1767, 2012.
- CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 645 – 654, 2006.
- CHANG, Y. Y.; LIN, Y. L.; YANG, D. J.; LIU, C. W.; HSU, C. L.; TZANG, B. S.; CHEN, Y. C. Hepatoprotection of noni juice against chronic alcohol consumption: lipid homeostasis, antioxidation, alcohol clearance, and anti-inflammation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 11016-11024, 2013.
- CHAOUAT, G. E. R.; LEDÉE-BATAILLE, N.; DUBANCHET, S.; ZOURBAS, S.; SANDRA, O.; MARTAL, J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost?. **International archives of allergy and immunology**, v. 134, n. 2, p. 93-119, 2004.
- CHATTERJEE, P.; CHIASSON, V. L.; BOUNDS, K. R.; MITCHELL, B. M. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. **Immune Interactions During the Reproductive Cycle**, v. 5, n. 253, p. 124, 2014.
- CHUNG, F. M.; TSAI, J. C. R.; CHANG, D. M.; SHIN, S. J.; LEE, Y. J. Peripheral Total and Differential Leukocyte Count in Diabetic Nephropathy The relationship of plasma leptin to leukocytosis. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1710-1717, 2005.
- DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G.; VOLPATO, G. T.; CONSONI, M.; RUDGE, M. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. **Anomalias Congênitas: Estudos Experimentais**. Coopmed: Belo Horizonte, 2008.

- DAMASCENO, D. C.; SILVA, H. P.; VAZ, G. F.; VASQUES-SILVA, F. A.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T. Diabetic Rats Exercised Prior to and During Pregnancy Maternal Reproductive Outcome, Biochemical Profile, and Frequency of Fetal Anomalies. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 7, p. 730-738, 2013b.
- DAMASCENO, D. C.; SINZATO, Y. K.; BUENO, A.; NETTO, A. O.; DALLAQUA, B.; GALLEGO, F. Q.; IESSI, I. L.; CORVINO, S. B.; SERRANO, R. G.; MARINI, G.; PICULO, F.; CALDERON I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1-9, 2013a.
- DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T. Antidiabetic Botanical Extracts. In: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.). *Botanical Medicine in Clinical Practice*. CAB International: London, 2008. p. 547-551, 2008.
- DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE M.V.C. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n.3, p. 235-244, 2002.
- DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; SINZATO, Y.K.; LIMA, P.H.; SOUZA, M.S.; IESSI, I.L.; KISS, A.C.I.; TAKAKU, M.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P. Genotoxicity and fetal abnormality in streptozotocin-induced diabetic rats exposed to cigarette smoke prior to and during pregnancy. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 120, p. 492-498, 2011.
- DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 4-7, 2004.
- DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; AMADO, C. A. B. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.
- DE SMET; PETER, A. G. M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 76, n. 1, p. 1-17, 2004.
- DEKEL, N.; GNAINSKY, Y.; GRANOT, I.; MOR, G. Inflammation and implantation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.63, p.17-21, 2010.

- DESOYE, G.; MOUZON, S. The human placenta in gestational diabetes mellitus the insulin and cytokine network. **Diabetes Care**, v. 30, n. Supplement 2, p. S120-S126, 2007.
- DI CIANNI, G.; MICCOLI, R.; VOLPE, L.; LENCIONI, C.; DEL PRATO, S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 19, n. 4, p. 259-270, 2003.
- ERLEBACHER, ADRIAN. Immunology of the maternal-fetal interface. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 387-411, 2013.
- EUROPEAN SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOODS. Opinion of the Scientific Committee on Food of Tahitian Noni® Juice. Scientific Committee of Food: Belgium, 2002.
- FAAS, M. M.; MOES, H.; VAN DER SCHAAF, G.; DE LEIJ, L. F. M. H.; HEINEMAN, M. J. Total white blood cell counts and LPS-induced TNF α production by monocytes of pregnant, pseudopregnant and cyclic rats. **Journal of reproductive immunology**, v. 59, n. 1, p. 39-52, 2003.
- FORD, W. C. L. The effect of 6-deoxy-6-fluoroglucose on the fertility of male rats and mice. **Contraception**, v. 25, n. 5, p. 535-545, 1982.
- FOWDEN, A. L., SFERRUZZI-PERRI, A. N., COAN, P. M., CONSTANCIA, M., & BURTON, G. J. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 14, p. 3459-3472, 2009.
- FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 515-526, 2004.
- FOWDEN, A. L.; WARD, J. W.; WOODING, F. P. B.; FORHEAD, A. J.; CONSTANCIA, M. Programming placental nutrient transport capacity. **The Journal of physiology**, v. 572, n. 1, p. 5-15, 2006.
- FOWLER, M. J. Diabetes treatment, part 1: diet and exercise. **Clinical Diabetes**, v. 25, n. 3, p. 105-109, 2007.
- FRANCHI, L. P.; GUIMARAES, N. N.; ANDRADE, L. R.; ANDRADE H. R.; LEHMANN M.; DIHL, R. R.; CUNHA, K. S. Antimutagenic and antirecombinagenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 585-594, 2013.

- FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumour potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1158-1164, 2003.
- GOMES, C. P.; TORLONI, M. R.; GUEUVOGHLANIAN-SILVA, B. Y.; ALEXANDRE, S. M.; MATTAR, R.; DAHER, S. Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: a systematic review of the literature. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, n. 6, p. 545-557, 2013.
- GUPTA, R. K.; PATEL, A. Do the health claims made for *Morinda citrifolia* (Noni) harmonize with current scientific knowledge and evaluation of its biological effects. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 8, p. 4495-4499, 2013.
- HAUGUEL-DE MOUZON, S.; GUERRE-MILLO, M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. **Placenta**, v. 27, n. 8, p. 794-798, 2006.
- HAWRYLUK, J.; GRAFK, A. A.; GEÇA, T.; LOPUCKI, M. Gestational diabetes in the light of current literature. **Polski Merkurusz Lekarski**, v. 38, p. 344-347, 2015.
- HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 380-387, 1999.
- HORNICK, C. A.; MYERS, A.; SADOWSKA-KROWICKA, H.; ANTHONY, C. T.; WOLTERING, E. A. Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (noni). **Angiogenesis**, v. 6, n. 2, p. 143-149, 2003.
- HUANG, H.; KO CH, Y. Y.; WANG, C. K. Antiadhesion and anti-inflammation effects of noni (*Morinda citrifolia*) fruit extracts on AGS cells during *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 11, p. 2374-2383, 2014.
- HVIID, T. V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 209-232, 2006.
- IESSI, I. L.; BUENO, A.; SINZATO, Y. K.; TAYLOR, K. N.; RUDGE, M. V.; DAMASCENO, D. C. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats:

- Maternal and fetal repercussions. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 2, n. 1, p. 1, 2010.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas**. ed. 7. Brussels: International Diabetes Federation, 2015.
- JAWERBAUM, A.; WHITE, V. Animal models in diabetes and pregnancy. **Endocrine Reviews**. v. 31, n. 5, p. 680-701, 2010.
- JOHNSEN, S. L., WILSGAARD, T., RASMUSSEN, S., HANSON, M. A., GODFREY, K. M., & KISERUD, T. Fetal size in the second trimester is associated with the duration of pregnancy, small fetuses having longer pregnancies. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.
- JONES, H. N.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Regulation of placental nutrient transport—a review. **Placenta**, v. 28, n. 8, p. 763-774, 2007.
- JUNG, M.; PARK, M.; LEE, H. C.; KANG, Y. H.; KANG, E. S.; KIM, S. K. Antidiabetic agents from medicinal plants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1203-1218, 2006.
- KAMANA, K. C.; SHAKYA, S.; ZHANG, H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 2, p. 14-20, 2015.
- KAMIYA, K.; HAMABE, W.; HARADA, S.; MURAKAMI, R.; TOKUYAMA, S.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 935-938, 2008.
- KEELY, E.; BARBOUR, L. A. Management of diabetes in pregnancy. **Endotext Internet**, 2014.
- KIM, F.; GALLIS, B.; CORSON, M. A. TNF- α inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n.5, p. C1057-C1065, 2001.
- KUZMICKI, M.; TELEJKO, B.; ZONENBERG, A.; SZAMATOWICZ, J.; KRETOWSKI, A.; NIKOLAJUK, A.; LAUDANSKI, P.; GORSKA, M. Circulating pro-and anti-inflammatory cytokines in Polish women with gestational diabetes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 40, n. 8, p. 556-560, 2008.
- KUZMICKI, M.; TELEJKO, B.; SZAMATOWICZ, J.; ZONENBERG, A.; NIKOLAJUK, A.; KRETOWSKI, A.; GORSKA, M. High resistin and

- interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. **Gynecological Endocrinology**, v. 25 n. 4, p. 258-63, 2009.
- LAPPAS, M.; YEE, K.; PERMEZEL, M.; RICE, G. E. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 3, p. 457-465, 2005.
- LEE, S. Y.; PARK, S. L.; HWANG, J. T.; YI, S. H.; NAM, Y. D.; LIM, S. I. Antidiabetic effect of *Morinda citrifolia* (Noni) fermented by Cheonggukjang in KK-Ay diabetic mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.
- LÓPEZ, S.; HERRERA, E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. **Experimental Diabetes Research**, v. 4, n. 2, p. 107–118, 2003.
- MAHADEVA, R.; SUBRAMANIAN, S. Biochemical evaluation of antihyperglycemic and antioxidative effects of *Morinda citrifolia* fruit extract studied in streptozotocin-induced diabetic rats. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 6, p. 433-446, 2009.
- MARQUES, N. F.; MARQUES, A. P.; IWANO, A. L.; GOLIN, M.; DE-CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J.; DALSENTER, P. R. Delayed ossification in Wistar rats induced by *Morinda citrifolia* L. exposure during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 85-91, 2010.
- MARTÍNEZ-VAREA, A.; PELLICER, B.; PERALES-MARÍN, A.; PELLICER, A. Relationship between maternal immunological response during pregnancy and onset of preeclampsia. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014.
- MCCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v. 1, n. 2, p. 110-120, 2002.
- MOLLER, D. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 11, p. 212–217, 2000.
- MONTE, S.; VALENTI, O.; GIORGIO, E.; RENDA, E.; HYSENI, E.; FARACI, M.; DOMENICO, R.; DI PRIMA, F. A. Maternal weight gain during pregnancy and

- neonatal birth weight: a review of the literature. **Journal of Prenatal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 27-30, 2011.
- MOR, G. Inflammation and pregnancy: the role of toll like receptors in trophoblast-immune interaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, p.121–128, 2008.
- MOR, G.; CARDENAS, I. Review article: the immune system in pregnancy: a unique complexity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 425-433, 2010.
- MORADI, S.; KERMAN, S. R.; ROHANI, F.; SALARI, F. Association between diabetes complications and leukocyte counts in Iranian patients. **Journal of Inflammation Research**, v. 5, p. 7-11, 2012.
- MORELI, J. B.; CORRÊA-SILVA, S.; DAMASCENO, D. C.; SINZATO, Y. K.; LORENZON-OJEA, A. R.; BORBELY, A. U.; RUDGE, M. V.; BEVILACQUA, E.; CALDERON, I. M. Changes in the TNF-alpha/IL-10 ratio in hyperglycemia-associated pregnancies. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 107, n. 3, p. 362-369, 2015.
- MORISSET, A. S.; DUBÉ, M. C.; COTE, J. A.; ROBITAILLE, J.; WEISNAGEL, S.; Tchernof, A. Circulating interleukin-6 concentrations during and after gestational diabetes mellitus. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 5, p. 524-530, 2011.
- MÜLLER, J. C.; BOTELHO, G. G.; BUFALO, A. C.; BOARETO, A. C.; RATTMANN, Y. D.; MARTINS, E. S.; CABRINI DA, O. M. F.; DALSENTER, P. R. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): In vivo and in vitro reproductive toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 229-233, 2009.
- MUSIAL, B.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; VAUGHAN, O. R.; OZANNE, S. E.; VOSHOL, P.; SFERRUZZI-PERRI, A. N.; FOWDEN, A. L. Proximity to delivery alters insulin sensitivity and glucose metabolism in pregnant mice. **Diabetes**, p. 1515-1531, 2016.
- MYATT, L. Placental adaptive response and fetal programming. **The Journal of Physiology**, v. 1, p. 25-30, 2006.
- NAYAK, B. S.; ISITOR, G.N.; MAXWELL, A.; BHOGADI, V.; RAMDATH, D. D. Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. **Journal of Wound Care**, v. 16, n. 2, p. 83-86, 2007.

- NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G.; ADOGWA, A. Hypoglycemic and hepatoprotective activity of fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in diabetic rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4,4 million participants. **The Lancet**, v. 387, p. 1513-1530, 2016.
- NEGRATO, C. A.; GOMES, M. B. Historical facts of screening and diagnosing diabetes in pregnancy. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2013.
- NERURKAR, P. V.; HWANG, P. W.; SAKSA, E. Anti-Diabetic Potential of Noni: The Yin and the Yang. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17684-17719, 2015.
- NERURKAR, P. V.; NISHIOKA, A.; ECK, P. O.; JOHNS, L. M.; VOLPER, E.; NERURKAR, V. R. Regulation of glucose metabolism via hepatic forkhead transcription factor 1 (FoxO1) by *Morinda citrifolia* (noni) in high-fat diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 02, p. 218-228, 2012.
- NGUYEN, P.H.; YANG, J. L.; UDDIN, M. N.; PARK, S. L.; LIM, S. I.; JUNG, D. W.; WILLIAMS, D. R.; OH, W. K. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from *Morinda citrifolia* (Noni) and their insulin mimetic activity. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2080-2087, 2013.
- OLIAEE, D.; BOROUSHAKI, M. T.; OLIAEE, N.; GHORBANI, A. Evaluation of cytotoxicity and antifertility effect of *Artemisia kopetdaghensis*. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2014, p. 1-5, 2014.
- PANTHAM, P.; AYE, I. L. M. H.; POWELL, T. L. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. **Placenta**, v. 36, n. 7, p. 709-715, 2015.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PIETRYGA, M.; BRAŻERT, J.; WENDER-OĘGOWSKA, E.; BICZYSKO, R.; DUBIEL, M.; GUDMUNDSSON, S. Abnormal uterine Doppler is related to vasculopathy in pregestational diabetes mellitus. **Circulation**, v. 112, n. 16, p. 2496-2500, 2005.

- PORTHA, B.; LEVACHER, C.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**, v. 23, n. 11, p. 889-895, 1974.
- POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit-phytochemistry, pharmacology, safety. **Planta Médica**, v. 73, n. 03, p. 191-199, 2007.
- PUDNEY, J.; HE, X.; MASHEEB, Z.; KINDELBERGER, D. W.; KUOHUNG, W.; INGALLS, R. R. Differential expression of toll-like receptors in the human placenta across early gestation. **Placenta**, v. 46, p. 1-10, 2016.
- RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13-31, 2016.
- RUHOMALLY, Z.; SOMANAHB, J.; BAHORUNB, T.; NEERGHEEN-BHUJU, V. *S. Morinda citrifolia* L. fruit extracts modulates H₂O₂-induced oxidative stress in human liposarcoma SW872 cells. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 3, p. 299-304, 2015.
- RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67, p.341–347, 1988.
- SAHIB, N. G.; HAMID, A. A.; KITTS, D.; PURNAMA, M.; SAARI, N.; ABAS, F. The effects of *Morinda citrifolia*, *Momordica charantia* and *Centella asiatica* extracts on lipoprotein lipase and 3t3-l1 preadipocytes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1186-1205, 2011.
- SAHIB, N.; SAARI, N.; ISMAIL, A.; KHATIB, A.; MAHOMOODALLY, F.; ABDUL HAMID, A. Plants' metabolites as potential antiobesity agents. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- SAITO, F. H.; DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G.; MORCELI, G.; SINZATO, Y. K.; TAYLOR, K. N.; RUDGE, M. V. C. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 2, n. 26, p. 1-8, 2010.
- SALLEH, N. Diverse roles of prostaglandins in blastocyst implantation. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- SANTOS, E. C. S.; ANTUNES, P. S.; DOS SANTOS, F. L. P.; ROCHA, A. D. O. B.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; MACEDO, C. L.; JACOB, K. C.; OLIVEIRA, N.A.; MEDEIROS, A. A.; DINIZ, M. D.; SÁ, R.C. Assessment of Pradosia

- huberi effects on the reproductive system of male rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 5, p. 519-526, 2016.
- SANTOS, T. M.; SINZATO, Y. K.; GALLEGO, F. Q.; IESSI, I. L.; VOLPATO, G. T.; DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, n. 4, p. 595-603, 2015.
- SASMITO, E.; HERTIANI, T.; NOVLITA, R. T., JAYA, L. B. Polysaccharide-rich fraction of noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) as doxorubicin co-chemotherapy: Evaluation of catalase, macrophages, and TCD8+ lymphocytes. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 3, p. 479, 2015.
- SERAFINI, M. R.; SANTOS, R. C.; GUIMARAES, A. G.; DOS SANTOS, J. P.; DA CONCEICAO, S. A. D.; ALVES, I. A.; GELAIN, D. P.; DE LIMA, NOGUEIRA, P. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.
- SEURING, T.; ARCHANGELIDI, O.; SUHRCKE, M. The economic costs of type 2 diabetes: A global systematic review. **Pharmaco Economics**, v. 33, n. 8, p. 811–31, 2015.
- SINZATO, Y. K.; DAMASCENO, D. C.; LAUFER-AMORIM, R.; RODRIGUES, M. M. P.; OSHIWA, M.; TAYLOR, K. N.; RUDGE, M. V. C. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumornecrosis factor- α as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 206-211, 2011.
- SINZATO, Y. K.; LIMA, P. H. O; CAMPOS. K. E.; KISS, A. C. I.; RUDGE, M. V.; DAMASCENO, D. C. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 4, p. 384-388, 2009.
- SINZATO, Y. K.; VOLPATO, G. T.; IESSI, I. L.; BUENO, A.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C.; DAMASCENO, D. C. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- SOARES, T.; DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. D. G.; RESENDE, F. M. C.; CORREA DOS SANTOS, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VOLPATO, G. T.

- Effect of *Himatanthus sucuuba* in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 104, n. 5, p. 190-195, 2015.
- STAPLES, R. E.; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.
- SU, C.; JENSEN, C.; STORY, S. **Tahitian noni juice on COX-1 and COX-2 and tahitian noni juice as a selective COX-2 inhibitor**. U.S. Patent Application n. 10/006,014, 4 dez. 2001.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.
- TAI, Mary M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes care**, v. 17, n. 2, p. 152-154, 1994.
- THAXTON, J. E.; SHARMA, S. Review article: Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 482-491, 2010.
- THELLIN, O.; HEINEN, E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. **Toxicology**, v. 185, n. 3, p. 179-184, 2003.
- TURNER, P. Influence of disease on drug toxicity. In: **Disease, Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs and Other Chemicals**. Springer Berlin Heidelberg, 1984. p. 33-38.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Federal Register 61(212):56274-56322. Washington, 1996.
- VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. D. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas Brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 2, p. 35-45, 2002.
- VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; RUDGE, M. V.; PADOVANI, C. R.; CALDERON, I. M. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 131-137, 2008.
- VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; SINZATO, Y. K.; RIBEIRO, V. M.; RUDGE, M. V.; CALDERON, I. M. Oxidative stress status and placental

- implications in diabetic rats undergoing swimming exercise after embryonic implantation. **Reproductive Science**, v. 22, n. 5, p. 602-608, 2015.
- VOLPATO, G. T.; MORAES-SOUZA, R. Q.; SOARES, T. S.; LEAL-SILVA, T.; DAMASCENO, D. C. Medicinal Plants for Diabetes Treatment During Pregnancy **Current Medicinal Chemistry**, [in press], 2017.
- WANG, M. Y.; SU, Chen. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York academy of sciences**, v. 952, n. 1, p. 161-168, 2001.
- WANG, M.Y.; HURN, J.; PENG, L.; NOWICKI, D.; ANDERSON, G. A multigeneration reproductive and developmental safety evaluation of authentic *Morinda citrifolia* (noni) juice. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 36, n. 1, p. 81-85, 2011.
- WANG, M.Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A. K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, 2002.
- WARD, D. T.; YAU, S. K.; MEE A. P.; MAWER, A. P.; MILLER, C. A.; GARLAND, H. O.; RICCARDI, D. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 4, p. 779–790, 2001.
- WENTZEL, P.; GÄRESKOG, M.; ERIKSSON, U.J. Decreased cardiac glutathione peroxidase levels and enhanced mandibular apoptosis in malformed embryos of diabetic rats. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3344-3352, 2008.
- WEST, B. J.; SU, C. X.; JENSEN, C. J. Prenatal toxicity test of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The journal of Toxicological Sciences**, v. 33, n. 5, p. 647-649, 2008.
- WEST, B. J.; WHITE, L. D.; JENSEN, C. J.; PALU, A. K. A double-blind clinical safety study of noni fruit juice. **Pacific Health Dialog**, v. 15, n. 2, p. 21-32, 2009.
- WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: Wilson, J. C.; Warkany, J. *Teratology: principles and techniques*. University of Chicago Press: Chicago, p. 262-327, 1965.
- WILSON, K.; BROMBERG, T. The influence of some disease states on drug disposition. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 189-200, 1980.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global report on diabetes**. WHO Press: Geneva, 2016.

- WU, M. Y.; CHEN, H. F.; CHEN, S. U.; CHAO, K. H.; YANG, Y. S.; HO, H. N. Increase in the production of interleukin-10 early after implantation is related to the success of pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 46, n. 6, p. 386-392, 2001.
- XU, J.; ZHAO, Y. H.; CHEN, Y. P.; YUAN, X. L.; WANG, J.; ZHU, H.; LU, C. M. Maternal circulating concentrations of tumor necrosis factor-alpha, leptin, and adiponectin in gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- YEH, CHANG-CHING; CHAO, KUAN-CHONG; HUANG, S. Joseph. Innate immunity, decidual cells, and preeclampsia. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 4, p. 339-353, 2013.
- YU, H.; LI, S.; HUANG, M. T.; HO, C. T. Antiinflammatory constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) fruits. In: **ACS Symposium Series**. Oxford University Press: São Francisco, 2008. p. 179-190.
- ZARETSKY, M. V.; ALEXANDER, J. M.; BYRD, W.; BAWDON, R. E. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, n. 3, p. 546-550, 2004.

ANEXO

ANEXO I - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para Animais de Pesquisa da UFMT.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.001991/13-1, sobre “Estudo de efeito de plantas medicinais sobre parâmetros materno-fetais na prenhez de ratas diabéticas”, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. GUSTAVO TADEU VOLPATO & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **27/06/2013**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.001991/13-1, entitled “Study of effect of medicinal plants on maternal-fetal parameters in diabetic pregnancy in rats”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Jun 27, 2013**.

Cuiabá-MT, 27 de junho de 2013.


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Prof.ª Dr.ª Nair Honda Kawashita
Vice-Presidente