

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ-REITORIA ACADÊMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Bianca Hessel Maschio

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO *Lentinula edodes* EM RATAS COM
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Sorocaba/SP

2017

Bianca Hessel Maschio

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO *Lentinula edodes* EM RATAS COM
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Gerenutti

Sorocaba/SP

2017

Bianca Hessel Maschio

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO *Lentinula edodes* EM RATAS COM
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade
de Sorocaba

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marli Gerenutti
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos
Universidade de Sorocaba

Dra. Nadini Oliveira Martins
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde, força e paz interior para a conclusão da minha dissertação.

Agradeço aos meus pais Valmir e Fátima que estiveram ao meu lado me apoiando durante todo meu mestrado. Ao meu marido Gustavo que sempre com muita calma e amor me apoiou.

Ao corpo docente do curso de mestrado, pelos ensinamentos, em especial a minha orientadora Profa. Dra. Marli Gerenutti, que com muita sabedoria e tranquilidade soube me guiar na orientação desta dissertação.

A todas as pessoas que durante este período me ajudaram direta ou indiretamente para que eu conseguisse finalizar esta etapa importante da minha vida.

Obrigada!

EPIÍGRAFE

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo fim.

(Chico Xavier)

RESUMO

O estudo foi dividido em duas etapas: na 1ª Etapa foi realizado um estudo de revisão integrativa da literatura sobre ensaios com DMG-STZ; na 2ª Etapa foi realizado um ensaio pré-clínico *in vivo* com animais DMG-STZ expostos ao cogumelo *Lentinula edodes*. A revisão integrativa da literatura seguiu as etapas preconizadas: formulação do tema, estabelecimentos de critérios de estudo, definições das informações extraídas dos estudos selecionados, avaliação dos estudos e apresentação dos resultados. Este trabalho foi desenvolvido através de método teórico descritivo e retrospectivo, por meio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos, e revisões literárias encontradas em uma base de dados. As buscas foram realizadas em publicações até maio de 2016. Foram encontrados 106 artigos os quais foram subdivididos em temas: avaliação de parâmetros bioquímicos maternos, avaliação fetal, avaliação de recém-nascidos, tratamento com produtos naturais. Entretanto, após a leitura dos mesmos, 48 artigos descrevem o DMG; 29 artigos referem-se e indução do diabetes por STZ antes da gestação; 03 artigos são de indução de diabetes pós-parto; 05 artigos são de revisão; e 21 artigos que embora se enquadrassem nos critérios de inclusão definidos, não atenderam aos objetivos desta revisão. O ensaio pré-clínico avaliou os feitos desse cogumelo sobre os parâmetros de capacidade reprodutiva, parâmetros bioquímicos, hematológicos, e de estresse oxidativo em ratas prenhes com diabetes induzido por estreptozotocina (DMG-STZ). Foi observada uma redução das perdas pré-implantação nos animais diabéticos tratados com *Lentinula edodes*. Além disto, os animais diabéticos apresentaram importantes alterações hematológicas e bioquímicas. Entretanto este cogumelo não foi capaz de reverter os efeitos deletérios causados pelo diabetes na gestação.

Palavras chaves: *Lentinula edodes*. Diabetes Mellitus Gestacional. Estreptozotocina

ABSTRACT

The study was divided into two stages: in the first stage an integrative review of the literature on GDM-STZ assays was performed; in second stage a pre-clinical in vivo test was performed with GDM-STZ animals exposed to the mushroom *Lentinula edodes*. The integrative review of the literature followed the recommended steps: theme formulation, establishment of study criteria, definitions of information extracted from selected studies, evaluation of studies and presentation of results. This work was developed through a descriptive and retrospective theoretical method, through a bibliographical survey of scientific articles, and literary reviews found in a database. The research was carried out in publications until May 2016. We found 106 articles which were subdivided into themes: evaluation of maternal biochemical parameters, fetal evaluation, evaluation of newborns and treatment with natural products. However, after reading them, 48 articles describe GDM; 29 articles refer to and induction of diabetes by STZ before gestation; 03 articles are for induction of postpartum diabetes; 05 articles are for review; And 21 articles that, although meeting the defined inclusion criteria, did not meet the objectives of this review. The pre-clinical study evaluated the effects of this mushroom on parameters of reproductive capacity, biochemical, hematological parameters, and oxidative stress in pregnant rats with streptozotocin-induced diabetes (GDM-STZ). A reduction of pre-implantation losses was observed in diabetic animals treated with *Lentinula edodes*. In addition, diabetic animals presented important hematological and biochemical alterations. However, this mushroom was not able to reverse the deleterious effects caused by diabetes during pregnancy.

Keywords - *Lentinula edodes*. Gestational Mellitus Diabetes. Streptozotocin

LISTA DE ABREVIATURAS

AGES – Produtos Finais da Glicação

AKT – Proteína quinase

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

COX₂ – Ciclooxygenase 2

DMG – Diabetes Mellitus Gestacional

DMG-STZ – Diabetes Mellitus Gestacional induzido por estreptozotocina

ED – Embriopatia Diabética

GR – Receptor de glicocorticoide

GLUT 1 – Transportador de glucose 1

GLUT 3 – Transportador de glucose 3

HBC – Células placentárias Hofbauer

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IGF I – Fator de crescimento Insulina-1

IGF II – Fator de crescimento Insulina-2

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LCAT – Lecitina-colesterol aciltransferase

LXRS – Receptor de fígado x

MAPK – Proteínas-quinases ativadas por mitógenos

NPY – Neuropeptídeo Y

RAGE – Receptor para produtos finais de glicação avançada

SNC – Sistema Nervoso Central

STZ – Estreptozotocina

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 CAPITULO 1 – REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA	12
3.1. Resultado da revisão integrativa da literatura	13
4 CAPITULO 2 – ENSAIOS PRÉ-CLÍNICO <i>IN VIVO</i>	43
4.1 Resultados do ensaio pré-clínico <i>in vivo</i>	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
ANEXO A – Documento aprovação CEUA	70
ANEXO B – Atestado de sanidade animal	71
ANEXO C – Certificados	72

1 APRESENTAÇÃO

Devido às grandes complicações que o diabetes mellitus gestacional (DMG) pode causar nos conceptos, muitos protocolos de estudos vêm empregando a estreptozotocina (STZ) como uma ferramenta importante para a compreensão das diversas sequelas que acometem os indivíduos expostos à hiperglicemia gestacional. Entretanto, existem muitas divergências entre os protocolos que empregam o modelo DMG-STZ. São poucos os estudos pré-clínicos *in vivo* com produtos naturais que abordam a redução dos efeitos da estreptozotocina sobre a capacidade reprodutiva de ratas.

Em estudos realizados com diversas espécies de cogumelos no tratamento das dislipidemias, observou-se que o *Lentinula edodes* (Shiitake) foi a espécie de fungo que apresentou os mais elevados teores de vitamina C, B12 e D. Cálcio, potássio, magnésio, fósforo, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco representam de 56 a 70% do total de cinzas deste cogumelo. Entretanto, o grande destaque dos valores nutricionais e medicinais do *Lentinula edodes* está relacionado ao teor de glucanas, em especial ao teor das β -glucanas. A β -glucana presente no *Lentinula edodes*, conhecida como lentinan ou lentinana, parece ser a responsável por algumas das propriedades medicinais deste cogumelo o que faz com que, tradicionalmente, seja utilizado para o tratamento de doenças como as dislipidemias e o diabetes.

Em nossos ensaios preliminares com *Lentinula edodes* em ratos machos, foi observado que a dose de 100 mg/Kg/dia apresenta potencial para o tratamento das dislipidemias. Nos estudos com ratas prenhes, observamos que as doses de 400 mg/Kg/dia e 800 mg/Kg/dia mostraram-se tóxicas tanto para as mães, quanto para o concepto.

O estudo foi dividido em duas etapas: na 1ª Etapa foi realizado um estudo de revisão integrativa da literatura sobre ensaios com DMG-STZ; na 2ª Etapa foi realizado um ensaio pré-clínico *in vivo* com ratas DMG-STZ expostas ao cogumelo *Lentinula edodes*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo busca avaliar os efeitos do *Lentinula edodes* sobre o diabetes gestacional de ratas, induzido por estreptozotocina (DMG-STZ), considerando-se suas potencialidades nutricionais.

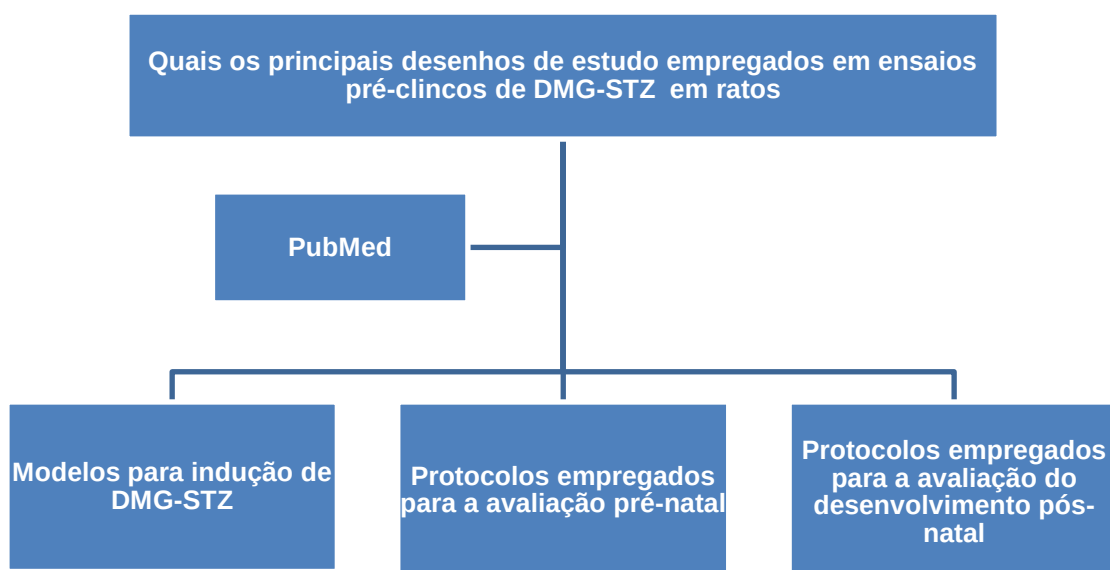
2.2 Objetivos específicos

- Avaliar na literatura os modelos empregados para estudos com DMG-STZ em ratos.
- Dosar as β -glucanas presentes nos cogumelos obtidos comercialmente.
- Avaliar a toxicidade do *Lentinula edodes* sobre a capacidade reprodutiva de ratas.
- Avaliar os efeitos protetores do *Lentinula edodes* sobre a atividade tóxica da estreptozotocina em ratas no início de gestação.

3 CAPÍTULO 1 - REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA

Realizou-se uma revisão integrativa da literatura que seguiu as etapas preconizadas: formulação do tema, estabelecimentos de critérios de estudo, definições das informações extraídas dos estudos selecionados, avaliação dos estudos e apresentação dos resultados. A figura 1 ilustra a indagação inicial da revisão sobre o DMG-STZ, os instrumentos e os produtos científicos avaliados.

Figura 1. Indagação inicial da revisão sobre DMG-STZ e os temas científicos avaliados.



Fonte: elaboração própria.

Este trabalho foi desenvolvido através de método teórico descritivo e retrospectivo, por meio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos, e revisões literárias encontradas na base de dados PubMed. Foram considerados os artigos publicados até maio de 2016.

Para busca virtual, empregaram-se três combinações de quatro descritores/palavras-chaves (busca 1): pregnancy AND hyperglycemia AND rats AND streptozotocin; (busca 2): pregnancy AND insulin resistance AND

rats AND streptozotocin; (busca 3): pregnancy AND glucose intolerance AND rats AND streptozotocin.

Os critérios de inclusão incluem: artigos disponíveis para livre acesso na íntegra, relevância e consonância aos objetivos desta pesquisa, artigos disponíveis no idioma inglês, português e espanhol.

Os critérios de exclusão incluem: títulos repetidos, artigos indisponíveis para livre acesso na íntegra, artigos disponíveis em outros idiomas.

Os artigos originais foram organizados inicialmente por área de conhecimento, compreendendo: objetivo, delineamento experimental, intervenção, metodologia, resultados e a indicação da origem dos artigos. Os artigos de revisão ou opinião foram utilizados no corpo do trabalho.

O resultado desta revisão integrativa é o artigo de revisão intitulado “Protocolos perinatais empregados para a avaliação do diabetes mellitus gestacional induzido por estreptozotocina em ratas”.

3.1 Resultado da revisão integrativa da literatura

Protocolos perinatais empregados para a avaliação do diabetes mellitus gestacional induzido por estreptozotocina em ratas.

Perinatal protocols employed for the evaluation of diabetes mellitus gestational induced for streptozotocin in rats.

Marli Gerenutti¹, Bianca Hessel Maschio², Leticia Favara Laurino³, Fabia Judice Marques Viroel⁴

¹Doutora em Patologia Experimental e Comparada pela Universidade de São Paulo, Professora Titular da Universidade de Sorocaba-SP, Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox), ²Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba-SP, ³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

da Universidade de Sorocaba-SP, ⁴Mestranda Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba-SP

Resumo

Introdução: Devido às complicações que o diabetes mellitus gestacional (DMG) pode causar nos conceitos, muitos protocolos de estudos vêm empregando a estreptozotocina (STZ) como uma ferramenta importante para a compreensão das diversas sequelas que acometem os indivíduos expostos à hiperglicemia gestacional, na fase adulta. **Objetivo:** Sintetizar os protocolos experimentais que vem sendo utilizados para os estudos de embriões, fetos e filhotes de ratos com DMG estreptozotocina induzida (DMG-STZ). **Metodologia:** Revisão integrativa da literatura das abordagens metodológicas quantitativas, aplicadas a estudos da DMG-STZ em ratos. Três pontos foram destacados nesta revisão: a) Doses e principais vias de administração da STZ, concentração plasmática de glicose para reconhecimento do DMG-STZ; b) Protocolos empregados para a avaliação pré-natal c) Protocolos empregados para a avaliação do desenvolvimento pós-natal. As doses encontradas variaram entre 30 e 135 mg/Kg para administração por via intraperitoneal; entre 15 e 65 mg/Kg para via intravenosa e na dose de 45 mg/Kg para via subcutânea. Os valores glicêmicos sanguíneos para reconhecimento do DMG ficaram entre 97 e 500 mg/dL. **Resultado:** Os estudos pré-natais abordaram a embriopatia diabética associada ao desenvolvimento do sistema nervoso central e à função renal, além das alterações no transporte útero-placentário-fetal; os estudos pós-natais enfatizaram a correlação entre a macrosomia neonatal e a dislipidemia pós-natal, o desenvolvimento comportamental pós-natal e as alterações cardiovasculares. **Conclusão:** Embora existam grandes diferenças metodológicas entre os protocolos empregados, podemos concluir, por esta revisão, que a DMG-STZ ainda é um bom modelo para os estudos dos efeitos da hiperglicemia sobre os conceitos.

Palavras-chave: Estreptozotocina, Diabetes Mellitus Gestacional, Macrosomia Fetal.

Abstract

Introduction: Due to the high complications that gestational diabetes mellitus (GDM) can cause in the concepts, many studies protocols have been using streptozotocin (STZ) as an important tool to understand the different sequelae that affect individuals exposed to gestational hyperglycemia in adulthood. **Objective:** Synthesize the experimental

protocols that have been used to study the embryos, fetuses and pups of rats with GDM-STZ. **Methodology:** In this work, we have developed an integrative literature review, including quantitative methodological approaches that can be applied to studies of GDM-STZ in rats. Three points were highlighted in this study: a) Doses and central routes of STZ administration, and plasma glucose concentration for recognition of GDM-STZ; B) Protocols used for prenatal evaluation c) Protocols used for the evaluation of postnatal development. The doses found ranged from 30 to 135 mg/kg for intraperitoneal administration; Between 20 and 65 mg/kg for the intravenous route and at the dose of 45 mg/kg for the subcutaneous route. The blood glucose values for recognition of GDM were between 97 and 500 mg/dL. Prenatal studies addressed diabetic embryopathy associated with central nervous system development and renal function in addition to changes in utero-placental-fetal transport. **Results:** On the other hand, postnatal studies emphasized the correlation between neonatal macrosomia and postnatal dyslipidemia, postnatal behavioral development and cardiovascular changes. **Conclusion:** Although there are large methodological differences between the protocols employed, we can conclude from this review that GDM-STZ is still a good model for the studies of the effects of hyperglycemia on the concepts.

Keywords: Streptozotocin, Gestational Mellitus Diabetes, Fetal Macrosomia.

INTRODUÇÃO

Emprego da estreptozotocina em protocolos experimentais

Segundo Shafir (2001) a primeira descrição dos sintomas de diabetes na literatura mundial foi registrada no papiro de Ebers (1550 a.C.). Este autor reporta que o diabetes se liga a descrição de poliúria a Imhotep, alto sacerdote e ministro do Faraó Zoser em 3000 a.C., dedicado à medicina. Posteriormente dois médicos gregos da Era Romana (130-201 d.C.) Galeno (Roma) e Arateus (Capadócia) delinearam esta doença (POTER, 1997). Segundo Major (1959), a descrição do diabetes grave, descrita por Arateus (150 d.C.), representou a soma de todos os conhecimentos até a segunda metade do século XVII :

“O diabetes é uma afecção maravilhosa, não muito frequente entre os homens, e se caracteriza pela liquefação da carne e dos membros em urina. Seu curso possui natureza fria e úmida, como na hidropisia. O curso é

comum, ou seja, os rins e a bexiga; pois os pacientes nunca param de produzir água e o fluxo é incessante, como na abertura de aquedutos. Portanto, a natureza da doença é crônica, levando um tempo bastante longo para se formar: porém a vida do paciente é curta, se a constituição da doença se estabelecer completamente, pois a liquefação é rápida e a morte mais rápida ainda."

Holemans et al. (2003) afirmam que os estudos pré-clínicos com animais e estudos epidemiológicos confirmaram que as perturbações no início da vida podem ter consequências persistentes na fase adulta. A maioria desses estudos associa a restrição do crescimento intrauterino ao risco aumentado de transtornos metabólicos futuros.

Farrell et al. (1982) , devido as dificuldades encontradas para a investigação do Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) em humanos, enfatizaram a necessidade da padronização de modelos de estudos com animais. Segundo Rees e Alcolado (2005), os modelos com animais têm sido amplamente utilizados na pesquisa sobre diabetes. Na descoberta e a purificação da insulina, foi confirmada a importância do pâncreas sobre a homeostase da glicose, utilizando cães como modelo animal. Atualmente a maioria dos experimentos utilizam os roedores, embora alguns estudos ainda sejam realizados em animais maiores. Entretanto, a escolha da espécie animal a ser utilizada nas investigações dependerá das hipóteses que estarão sendo abordadas.

Devido às grandes complicações que o diabetes pode causar durante o desenvolvimento pós-natal, modelos animais com diversos agentes químicos vem sendo empregados para aprofundar os conhecimentos sobre essa patologia, na tentativa de busca pelo tratamento mais eficaz. A estreptozotocina (STZ), agente antimicrobiano, é um dos exemplos de agente químicos, o qual vem sendo empregado há algumas décadas como indutor do diabetes em animais de experimentação. Seu efeito como droga β -citotóxica pancreática está bem caracterizado e a potência de seu efeito diabetogênico, depende da espécie animal empregada, das doses e das vias de administração (DAMASCENO et al. 2014; KANWAR et al. 2005). Entretanto, Caluwaerts et al. (2003) afirmam que doses baixas de STZ não são um bom modelo para DMG devido à alta variabilidade nos níveis de glicose, a resposta normal da insulina e a ausência de macrosomia fetal. Buchanan et al. (1994) afirmam que a taxa de glicose não é único

fator responsável pelo aumento dos índices de malformação fetal. Estes autores empregando ensaios *in vitro* com embriões tratados com soro de fetos provenientes de mães com DMG-STZ demonstraram que a administração de insulina pode reduzir os efeitos teratogênicos da hiperglicemia, entretanto a hipercetonemia acompanhada ou não de hiperglicemia, pode aumentar a taxa de malformação fetal.

Por outro lado, Lorenzo et al. (1983) ressaltaram que a administração oral de glicose durante o final da gestação aumenta a taxa de lipogênese hepática fetal pois aumenta a atividade das enzimas lipogênicas, entretanto a indução de DMG-STZ no final da gestação não altera esta lipogênese no feto.

Segundo Damasceno et al. (2014) a perda das ilhotas pancreáticas e a redução de massa celular produtora de insulina são aspectos relevantes da patogênese diabética. Além disto, estes autores consideraram a importância do estudo sobre a regeneração das células beta pancreáticas, não apenas para compreender os fatores envolvidos neste processo, mas também para fornecer novos conceitos que serão base para o tratamento do diabetes.

Natif et al. (2003) observaram que quando as mães DMG-STZ foram tratadas com o anti-hipertensivo Losartana ou com insulina, houve uma redução da hipertrofia renal e excreção proteica. A hiperlipidemia causada pelo DMG-STZ contribui diretamente para diminuição da ligação das proteínas plasmáticas com a insulina, diminuindo a distribuição desta pelo plasma (ANGER e PIQUETTE-MILLER 2010).

Por outro lado, utilização de extratos de plantas medicinais e de alguns alimentos, como adjuvantes no tratamento do DMG, há algumas décadas, tem despertado o interesse da comunidade científica. A utilização de *Albemoschus esculentus* (quiabo), por exemplo, demonstrou que na dose de 200 mg/Kg/dia, pode diminuir os níveis de estresse oxidativo e a resistência a insulina em ratos com DMG-STZ (TIAN et al. 2015). Yessoufou et al. (2014) ao estudarem os extratos de *Picralima nitida* (sementes), *Nauclea latifolia* (raiz e caule) e *Oxytenanthera abyssinica* (folhas), plantas comuns em países africanos, também observaram atividades antioxidantes, anti-hiperglicêmicas e imunossupressoras promissoras para as mães com DMG-STZ.

Sendo assim, o objetivo desta revisão é demonstrar os protocolos experimentais que vem sendo empregados para os estudos de embriões, fetos e filhotes de ratas com DMG-STZ.

MATERIAL E MÉTODOS

Metodologia empregada para busca e análise dos dados

Realizou-se uma revisão integrativa da literatura que seguiu as etapas preconizadas: formulação do tema, estabelecimentos de critérios de estudo, definições das informações extraídas dos estudos selecionados, avaliação dos estudos e apresentação dos resultados. Este trabalho foi desenvolvido através de método teórico descritivo e retrospectivo, por meio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos, e revisões literárias encontradas em uma base bancos de dados (PubMed). As buscas foram realizadas em publicações até maio de 2016.

Para busca virtual, foram empregadas três combinações de quatro descritores/palavras-chaves busca 1: pregnancy AND hyperglycemia AND rats AND streptozotocin; busca 2: pregnancy AND insulin resistance AND rats AND streptozotocin; busca 3: pregnancy AND glucose intolerance AND rats AND streptozotocin.

Os critérios de inclusão incluem: artigos disponíveis para livre acesso na íntegra, relevância e consonância aos objetivos desta pesquisa, artigos disponíveis no idioma inglês, português e espanhol. Os critérios de exclusão incluem: títulos repetidos, artigos indisponíveis para livre acesso na íntegra, artigos disponíveis em outros idiomas, tratamento em machos, animais transgênicos, avaliação *in vitro*.

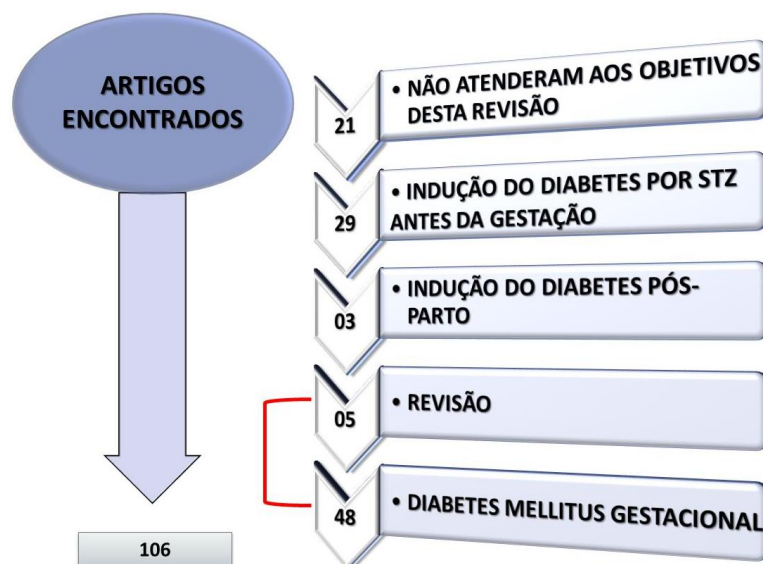
Foram selecionados artigos que empregaram os ratos: Sprague-Dawley (Albino, cabeça fina e cauda larga, bastante prolífera, mas menos resistente a enfermidades respiratórias); Wistar (Albino, de cabeça larga, com a cauda mais curta que o seu corpo, de orelhas largas, resistente a certas enfermidades respiratórias, porém menos prolíferas); e Long Evans (menor que as albinas, de pelo escuro ou negro em algumas partes da cabeça e do tronco dorsal, resistentes a enfermidades respiratórias que as albinas).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação e distribuição dos artigos encontrados

Foram encontrados 77 artigos na busca 1, 21 na busca 2 e 08 artigos na busca 3, totalizando 106 artigos, os quais foram subdivididos conforme a figura 2.

Figura 2. Quantificação e distribuição dos artigos encontrados.



Fonte: Elaboração própria

Os artigos selecionados para esta revisão foram subdivididos nos temas: modelos para indução de DMG-STZ; protocolos empregados para a avaliação pré-natal dos efeitos da DMG-STZ; e protocolos empregados para a avaliação da DMG-STZ no desenvolvimento pós-natal.

Modelos para indução de DMG-STZ

Os modelos para indução de DMG-STZ estão representados na Tabela 1, a qual indica as principais doses, vias de administração, os períodos da gestação onde ocorreu a exposição à STZ para a indução do DMG, o tampão utilizado para diluição e as linhagens dos animais. Os resultados apresentados na tabela 1 indicam que na definição de protocolos para DMG, as doses variaram entre 30 e 135 mg/Kg para administração por via intraperitoneal; entre 15 e 65 mg/Kg para via intravenosa e na dose de 45 mg/Kg para via subcutânea. O tampão utilizado para diluição da STZ, quando citado, foi o tampão citrato cujo pH variou entre 3,5 e 4,5. Observa-se que não houve uma

padronização dos dias de gestação para a indução do DMG-STZ, e estes variaram do 1º ao 13º dia após a confirmação da prenhes. Quatorze trabalhos não confirmaram a DMG-STZ, sendo que a dosagem de glicemia foi realizada apenas no decorrer dos experimentos, ou seja, durante a realização dos protocolos de estudo. Nos trabalhos onde a DMG-STZ foi confirmada, os autores consideraram como diabetes os valores glicêmicos sanguíneos entre 97 e 500 mg/dL e valor urinário de 342 e 500 mg/dL.

[inserir tabela 1]

Protocolos empregados para a avaliação pré-natal dos efeitos da DMG-STZ

Os protocolos encontrados para a avaliação embrionária e/ou fetal dos conceitos de mães DMG-STZ foram abordados em 22 artigos que compreenderam estudos como a análise de embriopatia diabética no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e na nefrotoxicidade, além das alterações no eixo útero-placentário-fetal, dosagens de insulina e hormônios fetais e, efeitos protetores sobre o embrião. A tabela 2 mostra os protocolos para a avaliação fetal e placentária de animais com DMG-STZ.

A embriopatia diabética (ED) é um processo teratogênico multifatorial que pode induzir primariamente alterações na membrana do saco vitelínico, como restrições no crescimento embriofetal e, também, podem produzir modificações nas estruturas celulares afetando os processos bioquímicos fetais. Este processo pode desencadear caminhos de sinalização apoptótica e inibir as vias de sobrevivência celular, induzindo malformações embrionárias (REECE et al. 2005).

Um dos principais alvos da ED é o SNC e o antioxidante mio-inositol, que está diretamente envolvido com a redução das alterações no SNC na hiperglicemia. A hiperglicemia pode causar deficiência intracelular deste antioxidante cuja restauração intracelular pode ser benéfica na prevenção de danos do diabetes. A suplementação dietética com mio-inositol e/ou mio-inositol associado ao ácido aracnóico e vitamina E, reduz a incidência de embriopatia diabética e pode servir como uma profilaxia farmacológica contra malformações congênitas do SNC no DMG, reduzindo a taxa de apoptose e de malformações embrionárias (REECE et al. 2006; REECE et al. 2005; REECE et al. 1997; SUSSMAN e MATSCHINSKY 1988).

A hiperglicemia promove um retardo do desenvolvimento dendrítico, resultante da sinalização anormal do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

- IGF-1R no cérebro fetal, e atrasar o remodelamento e a maturação das estruturas derivadas das células da crista neural (SALAZAR et al. 2015; JING et al. 2014).

Singh et al. (1997) utilizando modelos de hiperglicemia fetal e o hiperinsulinismo intracerebroventricular, observaram supressão das concentrações de neuropeptídeo Y (NPY) no cérebro fetal. O NPY é um neurotransmissor que media as funções biológicas como reatividade vasomotora, função sexual, produção de hormônios e controle metabólico, sendo que sua redução pode induzir a um comportamento anoréxico.

O DMG favorece a formação de produtos finais de glicação avançada, os AGEs (Advanced Glycation End-products). O estresse oxidativo, base da disfunção endotelial envolvida nas complicações vasculares na DMG resultam da interação AGE-RAGE (receptor para AGE), a qual inicia uma cascata de processos inflamatórios e coagulantes. As isoformas solúveis de RAGE (sRAGE e esRAGE) têm sido apontadas como preditores de risco para estas complicações. Entretanto Tang et al. (2015) observaram que a administração de sRAGE em ratas DMG-STZ, demonstrou efeito protetor no desenvolvimento dos fetos, pois atenuou o aumento da glicose sanguínea e reduziu as alterações fetais.

A exposição à hiperglicemia *in útero* também pode causar nefrotoxicidade, a qual está associada a uma diminuição da biodisponibilidade de IGF-II, receptor na patogenia da nefrogênese, levando a consequências renais tardias (DUONG et al. 2003; AMRI et al. 2001, AMRI et al. 1999).

O DMG-STZ pode afetar a regulação dos glicocorticóides nos fetos, contribuindo com o aumento da incidência da hipertensão arterial nos animais adultos (FUJISAWA et al. 2004). O estudo que propôs o tratamento com insulina para o DMG-STZ para avaliar a atividade periférica adrenocortical demonstrou que há normalização da glicose e da aldosterona fetal (MALEE e WU 1999).

A hiperglicemia da DMG promove alterações importantes no eixo útero-placentário-fetal, que podem afetar as células placentárias Hofbauer (HBC), estimulando as mesmas a desenvolver processos inflamatórios (SISINO et al. 2013). As anormalidades do crescimento placentário durante a DMG-STZ podem estar relacionadas aos níveis de receptor de glicocorticoide (GR) e das proteínas

transportadoras de glicose-3 (GLUT3) (KORGUN et al. 2011; BOILEAU et al. 1995); as concentrações anormais de glicose alteram os níveis de GLUT-1 na placenta, podendo resultar em hipóxia alterando o desenvolvimento fetal (DAS et al. 1998).

Medições das respostas colinérgicas das células da musculatura lisa das artérias uteroplacentárias indicam que a hiperglicemia do DMG promove uma deficiência severa na vasodilatação, alterando as propriedades mecânicas das artérias radiais uterinas. Embora a DMG não comprometa o crescimento vascular uterino materno esta disfunção contribui para a redução do fluxo sanguíneo uteroplacentário em animais (GOKINA et al. 2013; PHILLIPIS et al. 2012).

A hiperglicemia leve crônica na DMG-STZ gera um incremento da lipoperoxidação e um aumento da fluidez da membrana mitocondrial, aparentemente devido a alterações na composição de ácidos graxos que como consequência, gera um mau funcionamento mitocondrial da placenta (FIGUEROA-GARCÍA et al. 2015). A relação entre o esgotamento dietético do cromo e a DMG-STZ mostrou aumento da excreção de hidroxiprolina urinária das mães e redução do peso da placenta, das proteínas fetais e das concentrações de IGF-I e IGF-II fetal, entretanto o cromo não teve efeito nos hormônios maternos, na glicose, e na hidroxiprolina da placenta e do feto (SPICER et al. 1998).

Falkay et al. (2007) considera ainda que o DMG deprime as funções adrenérgicas pré-sinápticas do miométrio, servindo como um possível marcador de neuropatias periféricas na hiperglicemia da gestação.

[inserir tabela 2]

Protocolos empregados para a avaliação da DMG-STZ no desenvolvimento pós-natal

Dezenove estudos que abordaram a avaliação do desenvolvimento de filhotes de mães com DMG-STZ apontaram que as principais alterações dizem respeito à resistência insulínica com consequente obesidade na fase adulta, alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central resultando de mudanças de comportamentais e, comprometimentos cardiovasculares (tabela 3).

Quantidades moderadas de STZ podem ser utilizadas para estudar as alterações fisiopatológicas em diferentes condições de DMG-STZ (LÓPEZ-SOLDADO e HERRERA 2003). A macrosomia neonatal parece estar associada a alterações no metabolismo de colesterol na idade adulta, sendo que a gravidez diabética deve ser considerada como um dos potenciais fatores de risco para doenças metabólicas posteriores como a dislipoproteinemia em adultos (MERZOUK et al. 2001). Merzouk et al. (2002) ao avaliarem a ontogênese das lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL1, HDL2 e HDL3) e da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e teciduais em prole descendentes de ratos obesos ligeiramente hiperglicêmicos, observaram que o aparecimento de resistência à insulina estava associado às anormalidades destas lipoproteínas.

As dietas ricas em gorduras aceleram o desenvolvimento de resistência à insulina, principalmente através de uma resposta compensatória de ilhotas pancreáticas (SONG et al. 2012). Embora filhotes de DMG-STZ com dieta balanceada apresentem hipertensão e intolerância à glicose, não possuem alterações no metabolismo lipídico (BLONDEAU et al. 2011). Por outro lado, a restrição nutricional pós-natal pode resultar na reversão da obesidade no adulto, explicando assim, a heterogeneidade fenotípica que existe nestes descendentes (THAMOTHARAN et al. 2003).

OH et al. (1991) em estudos de 3 gerações com ratos macrossômicos afirmam que a perpetuação da obesidade e a intolerância à glicose entre gerações é o resultado de alterações metabólicas intrauterinas e não estão relacionadas a fatores genéticos. A tolerância glicêmica anormal observada em progênie obesa e hiperinsulinêmica se devem a resposta dos adipócito e da menor capacidade de ligação ao receptor de insulina (GELARDI et al. 1990).

Segundo Chandna et al. (2015) a hiperglicemia materna crônica pode alterar o desenvolvimento normal do hipocampo e o comportamento da prole, efeitos que podem ser mediados pelo aumento da sinalização de receptores AGES (receptores de produtos finais da glicação - RAGE) no cérebro fetal, induzindo retardo no desenvolvimento de mudanças de estratégia pelos animais. Filhotes de mães DMG, durante o período neonatal e pós-natal apresentam alterações específicas dos sistemas catecolaminérgicos dos reguladores hipotalâmicos do peso corporal e metabolismo, resultando na

diminuição do peso corporal e no aumento da insulina pancreática (PLAGEMANN et al. 1998). DMG-STZ aumenta a susceptibilidade para a ocorrência de doenças relacionadas a desordens metabólicas também relacionadas aos receptores LXR α s (receptor X hepático) no hipocampo e hipotálamo de filhotes (KRUSE et al. 2014).

A exposição a um ambiente hiperglicêmico durante o último terço da gestação resulta em anormalidades cardiovasculares na prole e as consequentes disfunções cardíacas podem persistir na fase adulta (AGOUEDEMOS et al. 2011; SEGAR et al. 2009). O grau de hiperglicemia materna pode determinar o tipo de cardiomiopatia observada na descendência, ao passo que a resolução das cardiomiopatias hipertrófica e dilatada está associada à ativação da sinalização MAPK (ativação por mitógenos das proteínas quinases) e das vias apoptóticas (REINKING et al. 2009). Em contrapartida, Nasu-Kawaharada et al. (2013) observaram que a alimentação rica em óleo de peixe de mães DMG-STZ pode elevar os níveis da proteína quinase (Akt) cardíaca nos filhotes, diminuindo o risco de hipertrofia cardíaca.

A DMG-STZ afeta a função cardiovascular na prole, induzindo hipertensão, por disfunção barorreflexa e ativação do sistema renina-angiotensina, além do aumento na resposta contrátil dos vasos de resistência (RAMOS-ALVES et al. 2012; WICHI et al. 2005). Os autores acreditam que o papel dos prostanóides derivados de COX-2 podem contribuir nessa elevação da resistência vascular e da pressão sanguínea. Katkhuda et al. (2012) afirmam que a mudança da sinalização de espécies reativas de oxigênio também contribuem para a alteração da hemodinâmica. Algumas alterações nas células sanguíneas, como a redução de neutrófilos podem ocorrer na idade adulta (BLUE et al. 2015).

[inserir tabela 3]

CONCLUSÃO

As principais vias de administração empregadas nos modelos foram a via intravenosa e a intraperitoneal; as doses administradas variaram entre 15 e 135 mg/Kg da STZ; a concentração plasmática de glicose para reconhecimento do DMG-STZ variou entre 97 e 500 mg/Kg; as linhagens Sprague-Dawley e Wistar foram as mais empregadas no modelos. Os estudos pré-natais abordaram a embriopatia diabética associada ao desenvolvimento do sistema nervoso central e à função renal além das

alterações no transporte útero-placentário-fetal. Já os estudos pós-natais enfatizaram a correlação entre a macrosomia neonatal e a dislipidemia pós-natal, o desenvolvimento comportamental pós-natal e as alterações cardiovasculares. Embora existam grandes diferenças metodológicas entre os protocolos empregados, especialmente quando às doses e ao tempo de indução do DMG podemos concluir, que a DMG-STZ ainda é um bom modelo para os estudos dos efeitos da hiperglicemia sobre os conceitos.

REFERÊNCIAS

AGOUDEMOS, M. et al. Programming of adult cardiovascular disease following exposure to late-gestation hyperglycemia. **Neonatology**, v. 100, n. 2, p. 198-205, 2011.

AMRI, K. et al. Altered nephrogenesis due to maternal diabetes is associated with increased expression of IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in the fetal kidney. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1069-1075, mai. 2001.

AMRI, K. et al. Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. **Diabetes**, v. 48, n. 11, p. 2240-2245, nov. 1999.

ANGER, G. J, Piquette-Miller M. Impact of hyperlipidemia on plasma protein binding and hepatic drug transporter and metabolic enzyme regulation in a rat model of gestational diabetes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 334, n. 1, p. 21-32, jul. 2010.

BLONDEAU, B. et al. Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. **Diabetes Metab**, v. 37, n. 3, p. 245-251, jun. 2011.

BLUE, E. K. et al. Fetal hyperglycemia and a high-fat diet contribute to aberrant glucose tolerance and hematopoiesis in adult rats. **Pediatr Res**, v. 77, n. 2, p. 316-325, fev. 2015.

BOILEAU, P. et al. Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. **J Clin Invest**, v. 96, n. 1, p. 309-317, jul. 1995.

BUCHANAN, T. A. et al. Diabetic teratogenesis, in vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se. **Diabetes**, v. 43, n. 5, p. 656-660, mai. 1994.

CALUWAERTS, S. et al. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? **J Soc Gynecol Investig**, v. 10, n. 4, p. 216-221, mai. 2003.

CHANDNA, A. R. et al. Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. **Neuroscience**, v. 10, n. 303, p. 241-260, set. 2015.

DAMASCENO, D. C. et. al. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. **Biomed Res Int**, 2014.

DAS, U. G. et al. Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. **Am J Physiol**, v.274, n.2, p. 339-347, fev. 1998.

DUONG, V. et. al. Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. **Cell Tissue Res**, v. 314, n. 3, p. 367-379, dez. 2003.

FALKAY, G. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the uterine adrenergic nerve function in pregnant rats. **Neurochem Int**, v. 51, n. 5, p. 306-310, out. 2007.

FARRELL, P. M. et al. Complications of Pregnancy and Fetal Development. **Diabetes**, v. 31, n. 1, p. 89-94, abr. 1982.

FIGUEROA-GARCÍA, M. del. C. et al. Even a Chronic Mild Hyperglycemia Affects Membrane Fluidity and Lipoperoxidation in Placental Mitochondria in Wistar Rats. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. 12, dez. 2015.

FUJISAWA, Y. et al. Streptozotocin-induced diabetes in the pregnant rat reduces 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in placenta and fetal kidney. **Life Sci**, v, 75, n. 23, p. 2797-2805, out. 2004.

GELARDI, N. L. et al. Glucose metabolism in adipocytes of obese offspring of mild hyperglycemic rats. **Pediatr Res**, v. 28, n. 6, p. 641-645, dez. 1990.

GOKINA, N. I. et al. Role of impaired endothelial cell Ca(2+) signaling in uteroplacental vascular dysfunction during diabetic rat pregnancy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 340, n. 7, p. 935-945, abr. 2013.

HOLEMANS, K. et al. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. **J Soc Gynecol Investig**, v. 10, n. 7, p. 392-399, out. 2003.

JING, Y. H. et al. Retardation of fetal dendritic development induced by gestational hyperglycemia is associated with brain insulin/IGF-I signals. **Int J Dev Neurosci**, v. 37, p. 15-20, out. 2014.

KANWAR, Y. S. et al. Hyperglycemia: its imminent effects on mammalian nephrogenesis. **Pediatr Nephrol**, v. 20, n. 7, p. 858-866, jul. 2005.

KATKHUDA, R. et al. Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. **Pediatr Res**, v. 72, n. 4, p. 352-361, out. 2012.

KORGUN, E. T. et al. Expression of glucocorticoid receptor and glucose transporter-1 during placental development in the diabetic rat. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 49, n. 2, p. 325-334, 2011.

KRUSE, M. S. et al. Sex differences in LXR expression in normal offspring and in rats born to diabetic dams. **J Endocrinol**, v. 222, n. 1. P. 53-60, jul. 2014.

LÓPEZ-SOLDADO I, HERRERA E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. **Exp Diabetes Res**, v. 4, n. 2, p. 107-118, abr. 2003.

LORENZO, M. et al. Regulation of lipogenesis in vivo by glucose availability and insulin secretion in maternal and foetal tissues during late gestation in the rat. Effect of glucose intubation, streptozotocin-induced diabetes and starvation. **Biochem J**, v. 216, n. 3, p. 695-699, dez. 1983.

MAJOR RH. II. Diseases of metabolism. In: Classic descriptions of disease with biographical sketches of authors. **Springfield, IL: Charles C Thomas**, v. 18, p. 235–237, 1959.

MALEE M. P, WU K. Y. Adrenocortical imprint in the fetus of a diabetic gestation. **Biol Neonate**, v. 76, n. 1, p. 44-54, jul. 1999.

MERZOUK, H. et al. Age-related changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7. P. 1152-1159, jul. 2001.

MERZOUK, H. et al. Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. **Lipids**, v. 37, n. 8, p. 773-781, ago. 2002.

NASU-KAWAHARADA R. et al. A maternal diet rich in fish oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic mother rats. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 688-692, abr. 2013.

NATIF, N. et al. A. Insulin and losartan reduce proteinuria and renal hypertrophy in the pregnant diabetic rat. **J Lab Clin Med**, v. 142, n. 3, p. 166-171, set. 2003.

OH W. et al. The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. **Pediatr Res**, v. 29, n. 6, p. 606-610, jun. 1991.

PHILLIPS, J. K. et al. Impact of experimental diabetes on the maternal uterine vascular remodeling during rat pregnancy. **Reprod Sci**, v. 19, n. 3, p. 322-331, mar. 2012.

PLAGEMANN, A. et al. Alterations of hypothalamic catecholamines in the newborn offspring of gestational diabetic mother rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 109, n. 2, p. 201-209, ago. 1998.

PORTER R. The greatest benefit to mankind, a medical history of humanity. **New York: WW Norton**, v. 71, 1997.

RAMOS-ALVES, F. E. et al. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.

REECE, E. A. et al. Dietary intake of myo-inositol and neural tube defects in offspring of diabetic rats. **Am J Obstet Gynecol**, v. 176, n. 3, p. 536-539, mar. 1997.

REECE, E. A. et al. Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II, apoptotic pathways. **Am J Obstet Gynecol**, v. 192, n. 3, p. 967-972, mar. 2005.

REECE, E. A. et al. Dietary vitamin and lipid therapy rescues aberrant signaling and apoptosis and prevents hyperglycemia-induced diabetic embryopathy in rats. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 2, p. 580-585, fev. 2006.

REES, D. A, ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet Med**, v. 22, n. 4, p. 359-370, abr. 2005.

REINKING, B. E. Cardiomyopathy in offspring of diabetic rats is associated with activation of the MAPK and apoptotic pathways. **Cardiovasc Diabetol**, v. 31, p. 8-43, jul. 2009.

SALAZAR, M. G. et al. Importance of maternal diabetes on the chronological deregulation of the intrauterine development: an experimental study in rat. **J Diabetes Res**, 2015.

SEGAR, E. M. et al. Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 3, p. 129-138, jul. 2009.

SHAFRIR, E. History and perspective of diabetes illustrated by postage stamps. **Freund Publishing House Ltd**, Mai. 2001.

SINGH, B. S. et al. Maternal diabetes-induced hyperglycemia and acute intracerebral hyperinsulinism suppress fetal brain neuropeptide Y concentrations. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 963-969, mar. 1997.

SISINO G. Diabetes during pregnancy influences Hofbauer cells, a subtype of placental macrophages, to acquire a pro-inflammatory phenotype. **Biochim Biophys Acta**, v. 32, n. 12, p. 1959-1968, dez. 2013.

SONG Y. et al. Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. **Exp Diabetes Res**, 2012.

SPICER, M. T. et al. Maternal and fetal insulin-like growth factor system and embryonic survival during pregnancy in rats: interaction between dietary chromium and diabetes. **J Nutr**, v. 128, n. 12, p. 2341-2347, dez. 1998.

SUSSMAN I, MATSCHINSKY, F. M. Diabetes affects sorbitol and myo-inositol levels of neuroectodermal tissue during embryogenesis in rat. **Diabetes**, v. 37, n. 7, p. 974-981, jul. 1988.

TANG X. et al. Protective effect of sRAGE on fetal development in pregnant rats with gestational diabetes mellitus. **Cell Biochem Biophys**, v. 71, n. 2, p. 549-556, mar. 2015.

THAMOTHARAN M. et al. Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 5, p. 901-914, mai. 2003.

TIAN, Z. H. et al. Therapeutic effect of okra extract on gestational diabetes mellitus rats induced by streptozotocin. **Asian Pac J Trop Med** v. 8, n. 12, p. 1038-1042, dez. 2015.

Yessoufou K, Bamigboye SO, Daru BH, van der Bank M. Evidence of constant diversification punctuated by a mass extinction in the African cycads. *Ecol Evol*. 2014 Jan; 4(1):50-8.

WICHI, R. B. et al. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 5, p. 1129-1133, mai. 2005.

Tabela 1 - Modelos para indução de DMG-STZ.

Espécie animal utilizada: Ratos Wistar							
Protocolo para a indução do DMG-STZ					Protocolo para a confirmação do DMG-STZ		Referência
N	Dose (mg/kg)	Diluição em Tampão Citrato	Via de administração	Dias de gestação	Níveis de glicose para confirmação do DMG-STZ	Dias de gestação avaliação de glicemia	
30	25	-	IV	1º	-	3º 13º 19º	TANG et al. 2015
10	30	pH = 4.5	IP	1º	-	20º	PLAGEMANN et al. 1998
30	40	pH = 4.5	IP	5º	100 -300 mg/dL	13º 16º 18º 20º	MERZOUK et al. 2001
13	40	pH = 4.5	IP	5º	100 -300 mg/dL	13º 16º 18º 20º	MERZOUK et al. 2002
6-20	45	pH = 4.5	IV	5º	-	7º 8º 9º	LORENZO et al. 1983
12	50	pH = 4.5	IV	7º	250-400 mg/dL	14º -21º	WICHI et al. 2005
07	50	-	IP	7º	250-500 mg/dL	14º	RAMOS-ALVES et al. 2012
10	55	pH = 4.5	IV	10º	500 mg/ dL (na urina)	11º 12º 13º (coleta por 24h)	NATIF et al. 2003
15	60	pH = 4.5	IV	2º	-	-	NASU-KAWAHARADA et al. 2013
9	60	-	IP	2º	≥ 300 mg/dL	3º -4º	JING HONG et al. 2014
-	65	pH = 4.5	IP	7º	-	21º	SISINO et al. 2013
6	65	-	IP	1º	-	4º	BOILEAU et al. 1995
10	135	pH = 4.5	IP	2º	200 mg/dL	21º	FIGUEROA-GARCÍA et al. 2015
-	20 (em 5 doses)	-	IP	5º ao 9º	-	12º - 16º	YESSOUFOU et al. 2013
6	30-35-40 ou 50	pH = 4.2	-	1º	-	-	CALUWAERTS ET al. 2003
Espécie animal utilizada: Ratos Sprague-Dawley							
Protocolo para a indução do DMG-STZ					Protocolo para a confirmação do DMG-STZ		Referência
N	Dose (mg/kg)	Diluição em Tampão Citrato	Via de administração	Dias de gestação	Níveis de glicose para confirmação do DMG-STZ	Dias de gestação avaliação de glicemia	
-	15 a 35	pH = 4.5	IV	3º	≥ 180 mg/dL	9º 21º	THAMOTHARAN et al. 2003
3	35 e 45	pH = 4.5	IP	1º	270-340 e > 360 mg/dL	3º	AMRI et al. 1999

12-17	25, 30 e 35	pH = 4.5	IV	1°	Entre 140 e 450 mg/dL	7°	LÓPEZ-SOLDADO E HERRERA 2003
46	50-55	-	IP	2°	≥ 126 mg/dL	-	PHILIPS et al. 2012
-	50-55	-	-	2°	-	4°	GOKINA et al. 2013
10	30	pH = 4.5	IV	1°	-	20°	SPICER et al. 1998
9	35	pH = 4.0	IV	1°	-	3°	FUJISAWA et al. 2004
4	35	pH = 4.5	IV	3°	≥180 mg/dL	5°	KRUZE et al. 2014
12	35	-	IP	1°	270 -360 mg/dL	3°	BLONDEAU et al. 2011
15	35	pH = 4.5	IP	5°	-	-	Oh et al. 1991
06	37	pH = 4.2	IP	5°	100 -300 mg/dL	18° 19° 20° 21°	GELARDI et al. 1990
-	40	-	-	1°	336 mg/dL	-	AMRI et al. 2001
8	40	pH = 4.5	IP	4°	300 mg/dL	6°	MALEE E WU. 1999
16	40	-	-	1°	97 mg/dL	4°	DUONG et al. 2003
10	40	pH = 4.3	IP	1°	≥ 360 mg/dL	Somente após o parto	SONG et al. 2012
5	45	pH = 4.5	SC	6°	≥ 252 mg/dL	7° - 20°	ANGER AND PIQUETTE-MILLER, 2010
-	45	pH = 4.4	IP	7°	250 -400 mg/dL	-	TIAN et al. 2015.
18	45	-	IV	12°	160 mg/dL	-	BLUE et al. 2015
3	50	pH = 4.5	IP	12°	-	1° - 21°	REINKING et al. 2009
6	50	-	IP	12°	200-400 mg/dL	-	AGOUEDEMOS et al. 2011
6-8	50	pH = 3.5	IP	13°	100-400 mg/dL	-	KATKHUDA et al. 2012
30	50	-	IP	5°	≥ 200 mg/dL	7°	SALAZAR et al. 2015
-	50	pH = 3.5	IP	13°	100-400 mg/dL	-	SEGAR et al. 2009
10	55	pH = 4.5	IV	6°	≥ 500 mg/dL	11°	SUSSMAN E MATSCHINSKY 1988
06	60		IV	1°	Não confirmou	-	FALKAY et al. 2007
04	60	pH = 4.5	IP	6°	≥ 250 mg/dL	13° 15° 17° 21°	KORGUN et al. 2011
6	60	-	-	12°	342 mg/dL (na urina)	-	SINGH et al. 1997
25-38	65	-	IP	-	>360 mg/dL	2°	BUCHANAN ET AL. 1994
5	65	-	IV	6°	≥250 mg/dL	9° 10°	REECE et al. 1997
-	65	-	IV	6°	250 mg/dL	8°	REECE et al. 2006

-	65	-	IV	6º	-	-	Reece et al. 2005
5	65	-	-	12º	180 mg/dL – moderada ≥ 243 mg/dL - severa	-	Das et al. 1998
Espécie animal utilizada: Ratos Long-Evans							
Protocolo para a indução do DMG-STZ					Protocolo para a confirmação do DMG-STZ		Referência
N	Dose (mg/kg)	Diluição em Tampão Citrato	Via de administração	Dias de gestação	Níveis de glicose para confirmação do DMG-STZ	Dias de gestação avaliação de glicemia	
10	50	-	IP	2-3 dias	≥ 270 mg/dL	-	CHANDNA et al. 2015

*N: número de animais por grupo; DMG-STZ: diabetes mellitus induzida por estreptozotocina; IP: via intraperitoneal; IV: via intravenosa; SC: via subcutânea

Tabela 2 - Protocolos para a avaliação fetal e placentária de animais com DMG-STZ.

Avaliação da embriopatia diabética associada ao desenvolvimento do sistema nervoso central e comportamento animal			
Objetivo	Metodologia	Resultados	Referencia
Avaliar as características antropométricas e desenvolvimento maxilofacial de fetos.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 6º dia de gestação, realização da cesárea no 21º dia de gestação. Fixação de fetos e avaliações morfológicas e histológicas.	Características morfológicas das estruturas maxilofaciais derivadas da crista neural, não compatíveis com a idade cronológica gestacional.	SALAZAR et al. 2015
Avaliar hipótese de que a lesão causada por hiperglicemia nas membranas do saco vitelino está associada à interrupção das vias de sinalização apoptóticas celulares.	Administração de 65 mg/Kg de STZ, por IV, no 6º dia de gestação, realização da cesárea no 12º dia de gestação. O DNA foi extraído de células de saco vitelino, para avaliação apoptose. A expressão proteica foi avaliada por ensaios de Western-blot.	Diminuição do nível de Akt fosforilado; aumento da proteína proapoptótica Bax; as alterações estão correlacionadas com a presença de fragmentação do DNA em células de saco vitelino do conceito diabético malformado.	REECE et al. 2005
Avaliar a suplementação dietética com antioxidantes na redução das taxas de malformação em ratos.	Administração de 65 mg/Kg de STZ, por via IV, no 6º dia de gestação, realização da cesárea no 12º dia de gestação. O DNA foi extraído de células de saco vitelino, a avaliação proteica foi realizada por ensaios de Western-blot.	A suplementação dietética reduziu das taxas de apoptose e malformações embrionárias.	REECE et al. 2006
Avaliar se nas mães tratadas com mio-inositol ocorre uma redução da embriopatia diabética.	Administração de 65 mg/Kg de STZ, por via IV, no 6º dia de gestação, realização da cesárea no 12º dia de gestação. Avaliação do tubo neural, da formação da placenta, e do peso do conceito.	A suplementação com mio-inositol reduziu da incidência de alterações no tubo neural, mas houve um aumento da taxa de reabsorção de embriões.	REECE et al. 1997
Avaliar os níveis de mioinositol e sorbitol no neuroectoderma que são afetados pela embriopatia diabética.	Administração de 55 mg/Kg de STZ, por via IV, no 6º dia de gestação, realização da cesárea no 12º dia de gestação. Dosagem por técnicas histoquímicas em tecido neuroectodérmico dos embriões de: ATP, ADP, fosfocreatina, creatina, glicose, malato, sorbitol e mio-inositol.	Aumento da glicose embrionária e de malato neuroectodérmico, elevando os níveis de sorbitol fetal; o teor de mioinositol do neuroectoderma não foi afetado.	SUSSMAN E MATSCHINSKY 1988

Avaliar o desenvolvimento do cérebro fetal e a relação da insulina e insulina-like -Fator de crescimento I (IGF-I).	Administração de 60 mg/Kg de STZ, por via IP, no 2º dia de gestação, realização da cesárea no 14º, 16º e 18º dia de gestação. Avaliação desenvolvimento dendrítico no córtex neuronal (determinação por Golgi –Cox) e os sinais de insulina / IGF-I foram avaliados por Western Blot.	Retardo no desenvolvimento dendrítico no feto do grupo hiperglicêmico materno, resultante da sinalização anormal da insulina / IGF-I no cérebro fetal.	JING et al. 2014
Avaliar o hiperinsulinemismo no sistema intracerebroventricular sobre a síntese do neuropeptídeo Y no cérebro fetal (NPY).	Administração de 60 mg/Kg de STZ, por via IV, no 3º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Avaliação das características antropométricas e metabólicas, avaliação de RNAm.	Não houve mudanças no hiperinsulinismo intracerebroventricular fetal, mas um declínio na concentrações de glicose fetal e dos níveis de peptídeos NPY, sem as as correspondentes quantidades de RNAm.	SINGH et al. 1997
Avaliar o efeito protetor do receptor secretor de produtos finais da glicação avançada (sRAGE) no desenvolvimento fetal.	Administração de 25 mg/Kg de STZ, por via IV, no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 19º dia de gestação. Administração de proteína sRAGE recombinante na mãe. Avaliação de níveis de glicose, níveis de produtos finais da glicação (AGE), proteínas RAGE no cérebro coração maternos, avaliação morfologia fetal.	Alterações maior ganho de peso em filhotes.	TANG et al. 2015

Avaliação da embriopatia diabética associada à função renal

Objetivo	Metodologia	Resultados	Referencia
Avaliar a se nefrogenese na hiperglicemia <i>in utero</i> está associada à modificação no padrão de expressão de receptores de IGF.	Administração de 40 mg/Kg de STZ, no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 18º dia de gestação. Avaliação das dimensões do crescimento insulínico utilizando o método de hibridização “in situ” e Imuno-histoquímica.	O fator de crescimento insulínico II /manose 6-fosfato não foi afetado pela hiperglicemia; não ocorreu desregulação no mesênquima dos néfrons de fetos.	DUONG et al. 2003
Avaliar os IGFs e seus receptores são afetados no desenvolvimento de renal na hiperglicemia.	Administração de 40 mg/Kg de STZ, por via IP no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 14º, 15º, 16º, 18º e 21º dias de gestação. Foram realizadas medidas de IGF e seus receptores,	Nefrogênese foi alterada em fetos expostos pode estar associada a uma diminuição da biodisponibilidade de IGF-II.A IGF-I não foi detectada, sugerindo apenas o papel crítico do IGF-II no desenvolvimento renal.	AMRI et al. 2001

	dosagens de proteínas e RNAm nos metanéfrons de fetos com idade gestacional entre 14-21 dias.		
Avaliar o efeito da hiperglicemia no desenvolvimento renal.	Administração de 35-40 mg/Kg de STZ, por via IP no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 16º dia de gestação. Indução de hiperglicemia na fase de organogênese e avaliação do número de néfrons e cultura de metanéfrons.	Redução do número de néfrons (10-35%) que pode induzir consequências renais tardias.	AMRI et al. 1999
Avaliar a relação entre hiperglicemia e o metabolismo de glicocorticóides em fetos com foco na 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2, responsável pela hipertensão infantil .	Administração de 35mg/Kg de STZ, por via IV, no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Isolamento de RNA de rins dos fetos e na placenta para avaliação por <i>Northern blotting</i> .	Redução da proteção fetal ao corticosteroide materno pela redução da 11- beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 nas placentas e nos rins.	FUJISAWA at al. 2004
Avaliar os aspectos moleculares e periféricos da atividade adrenocortical quando da exposição à insulina no final da gestação.	Administração de 40 mg/Kg de STZ, por via IP, no 4º dia de gestação, realização da cesárea no 21º dia de gestação. Avaliação de RNA, dosagens de glicose e determinações hormonais nas glândulas adrenais.	Aumento dos níveis de aldosterona nos animais hiperglicêmicos, após o tratamento com insulina, observou-se a normalização da glicose e da aldosterona fetais. Não foi observado efeito sobre a expressão adrenal fetal de RNAm de P450scc.	MALEE E WU 1999
Transporte útero-placentário-fetal			
Objetivo	Metodologia	Resultados	Referencia
Avaliar o efeito direto da hiperglicemia nas células placentárias Hofbauer (HBCs).	Administração de 65 mg/Kg de STZ, por via IP, no 4º dia de gestação, realização da cesárea no 21º dia de gestação. Avaliação do RNAm, dos níveis de proteína, e da atividade de macrófagos em placentas.	As HBCs estimuladas por glicose elevada trocaram seu perfil M2 em direção a M1 (citocinas pró-inflamatórias marcadoras de macrófagos)	SISINO et al. 2013
Avaliar a relação entre o transporte de glicose e o metabolismo do glicocorticoide, no desenvolvimento placentário, com foco no receptor de glicocorticoide (GR) e	Administração de 60 mg/Kg de STZ, por via IP, no 6º dia de gestação, realização da cesárea no 21º dia de gestação. Localização de GR e GLUT1 por imunohistoquímica na região coriolantoídea e saco	Indicação de que GR e GLUT 1 estão expressas nas células do trofoblasto e endotelial da zona labiríntica da placenta. A expressão de GR na zona de junção da placenta de rato foi detectada em células	KORGUN et al. 2011

proteína transportadores de glicose (GLUT 1).	vitelínico.	gigantes, e em algumas células de espongiotrofoblasto.	
Localizar na placenta as proteína transportadoras de glicose GLUTi e GLUT3 e para avaliar seus papéis na transferência de glicose da circulação materna para a fetal.	Administração de 65 mg/Kg de STZ, por via IP, no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Estudos imunocitoquímicos da proteína GLUTi na placenta expressa de forma ubíqua no (Lado materno) e a zona labiríntica (lado fetal).	Os níveis de RNAm e proteína de GLUT3 placentário aumentaram de quatro a cinco vezes em comparação com ratos não diabéticos. Os níveis de GLUT i permaneceram não modificados.	BOILEAU et al. 1995
Avaliar as alterações no transporte de glicose placentária e sua interferência com os níveis de proteína dependentes de glicose.	Administração de 65 mg/Kg de STZ, no 12º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Avaliação do tempo do transportador de glicose placentária (GLUT-1), e dos níveis de proteína por Western-blot nas artérias de ligação de crescimento intrauterino (IUGR).	A hipoglicemia fetal e hipóxia isquêmica resulta em um declínio de 50% na GLUT-1 placentária.	DAS et al. 1998
Avaliar os efeitos da DMG sobre o endotélio das artérias radiais uteroplacentárias.	Administração de 50-55 mg/Kg de STZ, por via IP, no 2º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Foram realizadas medições nas células da musculatura lisa (SMC) com microelétrodos de potencial de membrana, e as respostas dilatadoras à ACh em artérias uteroplacentárias.	Vasodilatação devido a uma deficiência da resposta endotelial. A diminuição da vasodilatação com a ACh foi associada à hiperpolarização das SMC nos animais diabéticos.	GOKINA et al. 2013
Avaliar o crescimento vascular uterino e as propriedades mecânicas de resistência passivas das artérias uterinas.	Administração de 50-55 mg/Kg de STZ, por via IP, no 2º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Medidas de vascularização uterina por esteromicroscopia.	Não foi observado alongamento axial da vasculatura uterina mesometrial. A espessura da parede vascular não se alterou entre os grupos. A distensibilidade da parede foi aumentada e a constante de uma função exponencial ajustada à curva tensão-deformação foi significativamente reduzida demonstrando diminuição da rigidez em artérias radiais uterinas diabéticas em comparação com os controles	PHILIPIS et al. 2012

Avaliar a atividade mitocondrial e a produção de lipoperoxídeos, a fluidez da membrana mitocondrial e a composição de ácidos graxos em fetos.	Administração de 135 mg/Kg de STZ, por via IP, no 2º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Isolamento de mitocôndrias e medidas da lipoperoxidação, atividade da respiratória mitocondrial, composição de ácidos graxos, fluidez da membrana mitocondrial.	Diminuição da proporção dos ácidos graxos insaturados e saturados no tecido placentário total, aumento das mitocôndrias placentárias. Aumento da fluidez da membrana mitocondrial da placenta.	FIGUEROA-GARCÍA et al. 2015
Avaliar a relação entre o esgotamento dietético do cromo e a DMG-STZ.	Administração de 30 mg/Kg de STZ, por via IV, no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 20º dia de gestação. Dosagens de insulina, glicose, determinação das concentrações de IGFBP, IGF-I e IGF-II fetal e placentária.	Redução do peso da placenta, das proteínas fetais e das concentrações de IGF-I e-II fetais. O cromo não teve efeito na glicose e na hidroxiprolina da placenta e do feto.	SPICER et al. 1998
Avaliar o impacto de diabetes sobre as funções pré-sinápticas do útero de rato em relação à idade gestacional.	Administração de 60 mg/Kg de STZ, por via IV, no 1º dia de gestação, realização da cesárea no 21º dia de gestação. Utilização de técnica de e superfusão para determinar a quantidade de transmissor liberado e a capacidade de captação total de cada amostra.	Diminuição da capacidade de captação de noradrenalina no 7º dia da gravidez.	FALKAY et al. 2007

Tabela 3 - Avaliação de descendentes de animais com DMG-SZT.

Correlação entre a macrosomia e a dislipidemia pós-natal			
Objetivo	Metodologia	Resultados	Referencia
Avaliar diferentes doses de STZ e suas ações fisiopatológicas a curto e em longo prazo, na descendência.	Administração de 25, 30 ou 35 mg/Kg de STZ, por via IV, no 1º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 70 dias de vida. Avaliação bioquímica da prole, coleta de sangue por decapitação.	Perda de peso, aumento dos níveis de glicose e de triglicerídeos plasmáticos e redução da insulina.	LÓPEZ-SOLDADO E HERRERA. 2003
Avaliar o impacto da macrosomia diabética no metabolismo do colesterol e das lipoproteínas.	Administração de 40 mg/Kg de STZ, por via IP, no 5º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 30 e 90 dias de vida. Isolamento de frações de lipoproteínas, avaliação sanguínea e hepática de colesterol total, avaliação da LCAT, avaliação da atividade microsomal enzimática.	Aumento de LDL-HDL e do colesterol associados à atividade aumentada de LCAT, no primeiro mês de vida. Aos 3 meses, os ratos macrossômicos desenvolveram hipercolesterolemia com aumento de todas as lipoproteínas.	MERZOUK et al. 2001
Avaliar a evolução das lipoproteínas séricas (VLDL,LDL-HDL1, HDL2-3) e da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) sérico e teciduais lipolíticas teciduais (fígado, músculo) em prole descendentes de obesos ligeiramente hiperglicêmicos.	Administração de 40 mg/Kg de STZ, por via IP, no 5º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 90 dias de vida. Avaliação do perfil lipoproteico de filhotes, através de eletroforese, isolamento de frações proteicas.	Os filhotes de mães diabéticas e obesas apresentaram maiores níveis de glicose, insulina e lipoproteína (VLDL, LDL-HDL1, HDL2-3). Após 1 mês de vida, não foram encontradas diferenças entre os grupos. A LCAT, tecido adiposo, triacilglicerol hepático e as lipases estavam elevadas.	MERZOUK et al. 2002
Avaliar se a hiperglicemia perinatal e dieta rica em gorduras interferem nos níveis metabólicos da prole.	Administração de 40 mg/Kg de STZ, por via IP, no 1º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 91 dias de vida. Avaliação de HDL, colesterol total, triglicérides e LDL e histologia do pâncreas.	Filhotes com redução do peso e inibição do crescimento, esteatose hepática severa, redução do HDL e aumento das ilhotas pancreáticas.	SONG et al. 2012
Avaliar a síndrome metabólica em filhotes com dieta balanceada.	Administração de 35 mg/Kg de STZ, por via IP, no 1º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 12 e 18 meses de vida. Avaliação de tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, níveis plasmáticos de lipídeos e morfologia pancreática.	Baixa tolerância à glicose, baixos níveis de insulina, aumento da pressão arterial, aumento dos níveis de triglicerídeos plasmáticos, e valores de HDL e colesterol total não foram alterados.	BLONDEAU et al. 2011

Avaliar se a prole quando exposta a altas concentrações de glicose e/ou de insulina <i>in utero</i> desenvolverá alterações no mecanismo de transporte de glicose responsivo à insulina.	Administração de 15 a 35 mg/Kg de STZ, por via IV, no 3º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 180 dias de vida. Avaliação hipotalâmica das concentrações de neuropeptídeos, alterações em musculo esquelético e tecido adiposo, análise de transporte de proteínas.	A prole de mãe diabética com nutrição pós-natal <i>ad libitum</i> demonstrou aumento ingestão de alimentos e resistência à translocação induzida pela insulina GLUT4 no músculo esquelético e tecido adiposo branco.	THAMOTHARAN et al. 2003
Avaliar o efeito de geração cruzada no crescimento em ratos macrossômicos recém-nascidos de gestantes com hiperglicemia leve.	Administração de 35 mg/Kg de STZ, por via IP, no 5º dia de gestação. Estudos de 3 gerações com ratos macrossômicos	Fêmeas macrossômicas de segunda geração continuaram a ter intolerância à glicose durante gestação, filhotes com maior peso, e maiores níveis plasmáticos de insulina.	OH et al. 1991
Avaliar papel do tecido adiposo no desenvolvimento de intolerância à glicose na prole obesa de ratas com hiperglicemia.	Administração de 37 mg/Kg de STZ, por via IP, no 5º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 12 meses de vida. Avaliação de teor lipídico total de adipócitos, da oxidação de glicose, dosagem de insulina e de seus sítio de ligação em filhotes.	Resposta atenuada à insulina, à conversão de glicose em lipídeos e ácidos graxos. Menor capacidades de ligação ao receptor de insulina nos ratos macrossômicos.	GELARDI et al. 1990
Correlação entre a macrossomia e o desenvolvimento comportamental pós-natal			
Avaliar as mudanças na expressão de RAGE (produtos finais da glicação) cerebral e suas alterações sobre o comportamento da prole.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 13º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 1, 7 21 e 40 dias de vida. Western-blot de tecido cerebral. Avaliação comportamental com testes de atividade geral, plus-maze, retenção de memória, flexibilidade comportamental.	Menor inibição do pré-pulso, redução da ansiedade e preferência alterada do objeto-lugar. Em teste de aprendizado os filhotes DMG-STZ não diferem dos controles, mas demoram mais tempo para mudar para uma nova estratégia.	CHANDNA et al. 2015
Avaliar os níveis de catecolaminas hipotalâmicas de filhotes de mães DMG, durante o período neonatal e pós-natal.	Administração de 30 mg/Kg de STZ, por via IP, no 1º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 1 e 21 dias de vida. Foram avaliados os filhotes machos quanto ao peso, dosagem de insulina e de catecolaminas hipotalâmicas tirosina hidroxilase – 5-HT, norepinefrina e dopamina.	No 1º dia foi observado baixo peso e hiperglicemia, aos 21 dias houve diminuição do peso corporal e um aumento da insulina pancreática. Aumento dos níveis hipotalâmicos catecolaminas.	PLAGEMANN et al. 1998
Avaliar alterações precoces e tardias de receptores Liver-X (LXR) no hipocampo e hipotálamo de filhotes de mães DMG-STZ.	Administração de 35 mg/Kg de STZ, por via IV, no 3º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 30 a 180 dias de vida. Análise dos fragmentos retirados do hipotálamo e hipocampo de filhotes de mães DMG-STZ através do teste de Western blotting.	Alterações na expressão hipotalâmica de receptores LXR de filhotes.	KRUZE et al. 2014

Correlação entre a macrosomia e as alterações cardiovasculares

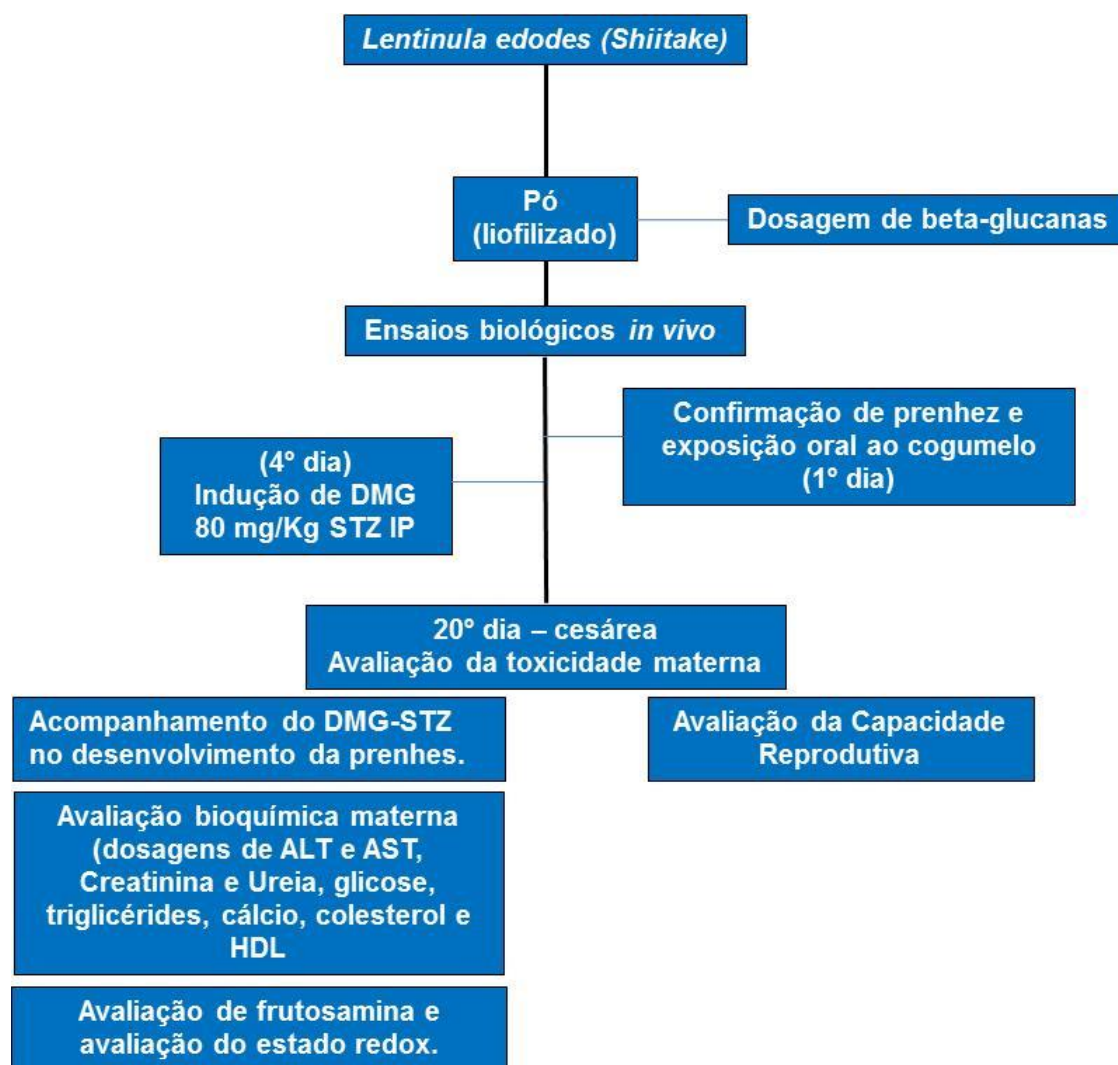
Avaliar anormalidades na função cardíaca e a susceptibilidade à isquemia na fase adulta.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 12º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 240 dias de vida. Avaliação por ecografia e técnica de Langendorff em coração isolado.	Disfunção diastólica <i>in vivo</i> e complacência ventricular esquerda em corações isolados. Presença de Isquemia.	AGOUEMOS et al. 2011
Avaliar a reatividade aórtica aos agentes vasodilatadores e vasorrelaxantes em descendentes de DMG da última semana de gestação.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 13º dia de gestação. Avaliação dos filhotes com 180 e 240 dias de vida. Teste de sensibilidade à insulina e teste de tolerância à glicose. Arteriografia, função vascular e análise morfométrica cardíaca.	As aortas apresentaram maior contratilidade ao cloreto de potássio. Não houve diferenças nas respostas à endotelina-1 e noradrenalina, mas observou-se aumento de relaxamento na presença de acetilcolina.	SEGAR et al. 2009
Avaliar se a remodelação cardiomiopática está associada à ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e vias apoptóticas.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 12º dia de gestação. Avaliação dos filhotes de 1 a 21 dias de vida. Avaliação por ecocardiograma e por Wester-blotting para avaliação dos níveis de proteínas apoptóticas.	Aumento da massa cardíaca, microsomia com redução relativa de massa cardíaca, dilatação cardiomiopática no primeiro dia pós-natal. Aumento persistente da proporção peso cardíaco/peso corporal e alteração de MAPK e vias apoptóticas após 21 dias.	REINKING et al. 2009
Analisar possíveis anormalidades circulatórias no coração de filhotes de mães DMG-STZ.	Administração de 60 mg/Kg de STZ, por via IV, no 2º dia de gestação. Avaliação dos filhotes de 1 a 50 dias de vida. Análise do músculo cardíaco dos filhotes expostos a dieta com diferentes porcentagens lipídicas.	Aumento dos níveis glicêmicos, aumento da enzima mTOR em filhotes de DMG-STZ tratados com dieta enriquecida com 21% óleo de peixe.	NASU-KAWAHARADA et al. 2013
Analisar o efeito DMG sobre a contração à noradrenalina no mesentério (ARM) de filhotes adultos, com ênfase no papel dos prostanoídes derivados da ciclooxigenase (COX).	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 7º dia de gestação. Avaliação dos filhotes de 90, 180 dias e 12 meses vida. Medida de pressão arterial, avaliação da produção de prostanoídes.	Aumento da participação de prostanoídes derivados de COX-2 na contração à noradrenalina no MRA (resistência das artérias mesentéricas).	RAMOS-ALVES et al. 2012

Avaliar em ratos machos filhos de DMG-STZ, parâmetros bioquímicos, cardiovasculares e o sistema conversor de angiotensina.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IV, no 7º dia de gestação. Avaliação dos filhotes de 60 dias vida. Avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade barorreflexa e responsividade vascular à fenilefrina e ao nitroprussiato de sódio. Dosagem de angiotensina no coração, nos rins e nos pulmões.	Aumentos na pressão sistólica, sem alteração na frequência nos batimentos cardíacos. Redução de taquicardia a responsividade vascular o pH aumentado. Aumento da atividade de angiotensina nos tecidos avaliados.	WICHI et al. 2005
Avaliar a influencia da hiperglicemia intrauterina, nas funções cardíacas como pressão arterial e responsividade vascular na fase adulta.	Administração de 50 mg/Kg de STZ, por via IP, no 13º dia de gestação. Avaliação dos filhotes de 180 dias e 12 meses de vida. Avaliação da hemodinâmica por técnica de quiomoluminescencia e reatividade vascular.	Aumento da pressão arterial, sem alteração na frequência nos batimentos cardíacos. Aumento da produção de superóxido estimulada pelo NADPH.	KATKHUDA et al. 2012
Avaliar as alterações hematopoiéticas na fase adulta de filhotes de mães com DMG-STZ.	Administração de 45 mg/Kg de STZ, por via IV, no 12º dia de gestação. Avaliação dos filhotes de 1 a 330 dias de vida. Quantificação de células pancreáticas, avaliação das células hematopoiéticas através de contagem total de células sanguíneas e avaliação da medula óssea dos filhotes.	Neutrofilia em filhotes adultos de mães DMG-STZ.	BLUE et al. 2015

4 CAPÍTULO 2 – ENSAIOS PRÉ-CLÍNICO *IN VIVO*

Trata-se de um ensaio pré-clínico *in vivo* (Figura 3). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba CEUA/UNISO Protocolo nº 048/2015 (ANEXO A).

Figura 3. Desenho do estudo



Fonte: Elaboração própria.

4.1 Resultado do ensaio pré-clínico *in vivo*

Os resultados parciais foram apresentados na “44th Annual Conference of the European Teratology Society, setembro de 2016, Dublin, Ireland” e publicados na revista *Reproductive Toxicology*, volume 64, p.32, 2016 (Figura 4) (Fator de impacto JCR: 2,85).

Figura 4. Resumo apresentado no 44th Annual Conference of the ETS (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.06.070>).



Reproductive Toxicology

Volume 64, September 2016, Pages 32

44th Annual Conference of the European Teratology Society



P-9

Effect of *Lentinula edodes* (Shiitake) in the reproductive performance of the female rats with streptozotocin-induced diabetes

Bianca H. Maschio , Lucas S. Rodrigues, Thaisa B. Pickler, Denise Grotto, Marli Gerenutti

[Show more](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.06.070> [Get rights and content](#)

Introduction: The *Lentinula edodes* mushroom, popularly known as Shiitake, contains high quantities of beta-glucans. It is a powerful antioxidant and is used in the treatment of hyperlipidemia and dyslipidemia. Streptozotocin (STZ), a drug used for experimental induction of gestational diabetes mellitus (GDM), is highly toxic and can cause maternal and embryolethality. The aim of this study was to evaluate the protective effects of *Lentinula* on reproduction in rats exposed to STZ at the pre-implantation embryonic period.

Methods: Pregnant rats received orally reconstituted powder-dehydrated *Lentinula edodes* mushroom (0.76 g beta-glucans per 100 g of mushroom) at daily doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg from the first to the twentieth day of gestation; a saline solution was administered to the control group. All the animals received STZ (80 mg/kg, i.P) on fourth day of pregnancy; blood glucose above 180 mg/dl was considered as severe GDM. The uterus were removed on day 21 by caesarean section. Maternal kidney and liver toxicity were assessed. The corpus luteum, implantations, reabsorptions, live and dead fetuses were counted.

Results: *Lentinula edodes* reduced pre-implantation loss. Changes were observed in aspartate aminotransferase (AST), low-density lipoprotein (LDL), and cholesterol. No changes were observed in glucose plasma ratio, creatinine, urea, high-density lipoprotein (HDL), and alanine aminotransferase (ALT).

Conclusion: *Lentinula edodes* has a protective effect, as indicated by the increased number of implantations in severe GDM animals. However, the doses of 100 mg/kg/day and 200 mg/kg/day, were not able to reduce maternal toxicity and embryolethality promoted by STZ.

 Corresponding author.
Copyright © 2016 Published by Elsevier Inc.

ELSEVIER

[About ScienceDirect](#) [Remote access](#) [Shopping cart](#)
[Contact and support](#) [Terms and conditions](#) [Privacy policy](#)

Cookies are used by this site. For more information, visit the [cookies page](#).
 Copyright © 2016 Elsevier B.V. or its licensors or contributors. ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.

 RELX Group™

O resultado final deste ensaio foi formatado para publicação em revista internacional.

**EFFECTS CHARACTERIZATION OF *Lentinula edodes* ON SEVERE
GESTATIONAL DIABETES MELLITUS IN RATS**

Short title: *Lentinula edodes* on gestational diabetes mellitus

Maschio BH^{1,2}, Gentil BC², Caetano ELA^{1,2}, Rodrigues LS², Laurino LF^{1,2}, Spim
SRV^{1,2}, Jozala AF^{2,3}, Santos CA¹, Grotto D^{1,2,3}, Gerenutti M^{*1,2,3}.

¹Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Development and Evaluation of Bioactive Substances.

²Laboratory of Toxicological Research (Lapetox), University of Sorocaba, UNISO, Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, Zip code: 18023-000, Sorocaba, SP, Brazil.

³Department of Technological and Environmental Processes, University of Sorocaba UNISO, Sorocaba, SP, Brazil

*Corresponding author

marli.gerenutti@prof.uniso.br

Phone: +55 15 2101 7104

Fax: +55 15 2101 7000

ABSTRACT: This study evaluated the protective effect of *Lentinula edodes* in rats with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus (GDM-STZ) when administered orally. The rats received doses of 100 mg/kg or 200 mg/kg of lyophilized *Lentinula edodes* and reconstituted from the 1st to the 19th day of gestation; the animals of the saline control group (CS) and diabetic control group (DS) received a saline solution. GDM was induced on the fourth day of pregnancy (STZ, 80 mg/kg, I.P.), blood glucose above 180 mg/dl was considered as GDM-STZ. A reduction of pre-implantation losses was observed in diabetic animals treated with *Lentinula edodes* and also important hematological and biochemical alterations. *Lentinula edodes* at the doses used showed to have a protective effect on the pre-implantation parameters in GDM-STZ. However, the mushroom was not able to reverse the deleterious effects caused by STZ about the evolution of pregnancy.

KEYWORDS: food safety, gestational diabetes mellitus, *Lentinula edodes*, medicinal mushrooms, reproductive toxicology.

ABBREVIATIONS: **ALT:** Alanine Transaminase; **AST:** Aspartate Transaminase; **CAT:** Catalase; **CS:** Control Saline Group; **DS:** Diabetic Saline Group; **DM:** Diabetes Mellitus; **DLe-100:** Diabetic+100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*; **DLe-200:** Diabetic+200 mg/kg/day of *Lentinula edodes*; **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid; **GDM:** Gestational Diabetes Mellitus; **GDM-STZ:** Gestational Diabetes Mellitus induced Streptozotocin; **GSH:** Reduced glutathione; **H₂O₂:** hydrogen peroxide; **H₃PO₄:** phosphoric acid; **HDL-Chol:** high-density lipoproteins; **KCL:** Potassium chloride; **LDL-Chol:** low-density lipoprotein; **MCH:** Mean Corpuscular Hemoglobin; **MCV:** Mean Corpuscular Volume; **MCHC:** Mean Corpuscular Hemoglobin

Concentration; **RBC**: Red Blood Cells; **STZ**: Streptozotocin; **TAG**: Plasma Triacylglycerol; **TBARS**: Thiobarbituric Acid Reactive substances; **TBA**: Thiobarbituric acid.

I. INTRODUCTION

In many countries, mushrooms are used on a large scale and represent significant importance in economics. Studies on their medicinal and nutritional properties are well accepted and well characterized. Mushrooms have medicinal, and food uses dating back at least four thousand years. In the Egyptian, Chinese and Japanese medicines, in particular, have been utilized for the treatment of chronic diseases.¹ Substances extracted from mushrooms can reduce blood pressure, total blood cholesterol and blood glucose level, as well as inhibit platelet aggregation.^{2, 3, 4}

Martin (2010)⁵ reports that mushrooms can protect against chronic diseases by altering inflammatory processes, especially those associated with cardiovascular diseases, in part because of their antioxidant activity and immunomodulation. The search for healthy foods and products such as mushrooms has also increased interest in preventive medicine.⁶

According with Wang et al.,⁷ fungal and microbial sources can be used as potential resources for natural antioxidants, since the consumption of synthetic drugs for this purpose has promoted some undesirable adverse effects. In this sense, in vivo studies showed that the association of *Lentinula edodes*, known as "shiitake" to zinc, increased the antioxidant potential of this element. Menghini et al.^{8,9} report that *Lentinula edodes* when used in formulations combined with other natural products, can act on the oxidative stress and release pro inflammatory cytokines that has antioxidant

and anti-inflammatory activity, besides being immunomodulatory. The anti-diabetic effects of *Lentinula edodes* are related to their content of phenolic compounds and glucans, although these species also contain a variety of other bioactive molecules.¹⁰

Regula et al.¹¹ observed that the addition of 10% and 20% of dry *Lentinula edodes* to the diet of iron-deficient female rats, resulted in a gradual replacement of this element in serum and liver with consequent increase in hemoglobin concentration. The bioavailability of iron from cereal products enriched with dry shiitake was comparable to that of Fe (II) gluconate, showing that *Lentinula edodes* is a rich source of iron, increasing nutritional value.

In addition to the nutritional value, several species of mushrooms have been identified as sources of antioxidant compounds. Carneiro et al.¹² studied the chemical composition of some formulations with dry powder of *Lentinula edodes* and observed a low fat content (<2 g/ 100 g), tocopherols content of 32 µg / 100 g and phenolic compounds of 690µg/100g, suggesting their indication in low-calorie diets, as a source of antioxidants and preventing diseases related to oxidative stress. The β-glucans from *Lentinula edodes* appear to be related to fat metabolism, resulting in a decrease in total blood cholesterol.¹³

Reverberi et al.¹⁴ observed that β-glucans were also able to stimulate antioxidant enzymes and inhibit the toxic action of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus*. In this sense, You et al.¹⁵ isolated three polysaccharides of different molecular weights from *Lentinula edodes* to evaluate their protective effects against oxidative stress induced in rats by D-galactose. They found that the polysaccharide with 306.2 kDa molecular weight may potentially be used as a natural antioxidant.

In view of the beneficial actions of *Lentinula edodes*, the aim of this work was to evaluate the protective effects of this mushroom on the toxic activity of streptozotocin in rats at the beginning of gestation.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Nutritional Composition of *Lentinula edodes*

Lentinula edodes (Berk.) Pegler-cultivated strain H600 (Hokken, Shimotsuga-gun, Japan) was provided by the commercial company Yuri Mushrooms (São Paulo, Brazil). The samples of fresh mushroom were trimmed, and cut into slices, on the same day of use and lyophilized (Thermo Fisher Scientific, USA®) for 48 h; the yield reached the ratio of 10% dry mass. The dried sample was milled (Marconi® - MA340, Brazil ®) after was sieved (50 mesh and 60 mesh), and packed in airtight plastic containers kept in a desiccator. For the characterization of the sample, β -glucans (β -Glucan Assay kit - Yeast & Mushroom; Megazyme, Bray, Eire) and phenolic compounds (method adapted Folin-Ciocalteu¹⁶) were dosed. The moisture content, total ashes, lipid and protein dosages were determined according to adapted methods described by Adolf Lutz Institute.¹⁷

B. Experimental Design

Seven-week-old Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. Albinus) which body weight varied from 250 to 300 g for the males and from 180 to 200 g for the females were purchased from Anilab (*Laboratório de Animais*, Paulínia, SP, Brazil). We allowed animals to habituate to the Alesco® microenvironment isolation cages under standard environmental conditions (22°C, 12:12 h dark/light cycle) while providing industrialized dry food (Purina®, São Paulo, Brazil) and tap water *ad libitum*. The study

protocol was approved by the Commission of Ethics in the Usage of Animals of the University of Sorocaba (approval number 048/2015; São Paulo, Brazil).

C. Assays with GDM-STZ

To allow mating, we housed up to one male together with four females for overnight periods. Each morning, the vaginal smear was taken to the microscope. The presence of sperm (Biological Microscope, Axio Lab. A1, ZEISS®), was designated as gestational day 1. For mating, was housed, 01 male with 04 females for a nocturnal period of 12 hours.¹⁸ On the fourth day of pregnancy, fasting blood glucose (6 hours) was dosed in the Freedom Lite Freestyle (Abbott), diabetes was induced by administration of streptozotocin (80 mg/kg, Sigma Chemical, St. Louis, MO) Diluted in 0.1 mol / l citrate buffer (pH 4.5) intraperitoneally. After 48 hours, the fasting glucose (6 hours) was performed again. Animals with glycemia above 180 mg/dL were considered diabetic.^{19, 20}

A total of 24 pregnant females caged in isolation from each other were randomly assigned to one of four groups: CS (saline solution 0.9%), DS (diabetic+saline solution 0.9%), DLe-100 (Diabetic+100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*) and DLe-200 (Diabetic+200 mg/kg/day of *Lentinula edodes*). Daily at 2:00 pm, from day 1 to day 19 of the gestational period, females received orally: 0.9% saline solution or *Lentinula edodes*.

Blood Collection and Pre-Implantation Loss Assessment

On the 20th day of pregnancy, females were anesthetized with xylazine (6 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) administered by intraperitoneal injection. Cesarean sections were performed using a longitudinal incision along the linea alba. Blood samples were collected from hepatic veins and divided into two tubes. One tube 'A' for

blood cell counts and oxidative stress evaluation containing Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). One vacuum tube 'B' with anticoagulation gel separator for evaluation of additional parameters. Females were then sacrificed and their womb and ovaries removed. All sampled material were conserved at -80°C before analysis except blood. Uterine cavities were checked for the number of fetuses, implantations, and visible resorptions. The ovaries were weighed, and corpus luteal counted.

Maternal hematologic parameters

For adult rats (tube A) it was also used the hematological analyser Sysmex® XS-1000i to determine the following parameters: RBC (red blood cell), hemoglobin, hematocrit, MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), platelet, leukocyte, lymphocyte, monocyte, and eosinophil counts. After this procedure, 500ul of blood were packed in eppendorf tube and stored at -80°C.

Maternal Biochemical Profile

There were carried out biochemical analysis of the pregnant rat's serum. These analyses were performed in an automated Cobas 111 Roche® spectrophotometer. Blood samples from tube 'B' was centrifuged in separate turns at 50 Hz and 41,7 Hz for 10 min. Blood serum and supernatant were collected afterward. The following parameters were determined: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine, urea, calcium, glucose, triacylglycerol, total cholesterol (LDL-Chol), and high-density lipoproteins (HDL-Chol).

Evaluation of Oxidative Stress Biomarkers

For the TBARS, GSH and CAT analyzes, a 5% liver homogenate was prepared weighing approximately 0.25 g of tissue and placing in a tube with 5.0 mL of 1.15%

KCl cold. The tissue was homogenized with the aid of an ultrasonic processor, always in an ice bath. For TBARS and GSH biomarkers, calibration curves were constructed. For the TBARS technique, a volume of 500 μ L of the homogenate was added to 1% H_3PO_4 and 0.6% thiobarbituric acid (TBA). The samples were incubated at 80 °C for 45 min, and then read in a spectrophotometer at 532 nm (Ohkawa et al., 1979). Calculations were done based on the fresh liver mass (0.250 g), and the results were expressed as μ mol/g tissue.

For GSH, 600 μ L of the homogenate was added to a solution of trichloroacetic acid (30%), homogenized on a shaker and centrifuged. The supernatant was then added to a buffered solution, and a chromophore (the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) was pipetted for reading at 412 nm.²¹ Calculations were done based on fresh liver mass (0.250 g), and the results were expressed as mmol GSH / g tissue.

The activity of the enzyme catalase (CAT) was evaluated by UV/VIS spectrophotometry using Aebi.²² The method is based on the decomposition of H_2O_2 , added to the test, by tissue catalase, over time, monitored at 240nm. To this end, the homogenate was diluted in phosphate buffer and the H_2O_2 was added, initiating the reaction. The changes in absorbance were monitored for three minutes at 240nm. To evaluate the activity of the enzyme, calculations were performed based on the fresh liver mass (0.250 g); the results were expressed in k / min / mg liver, with k being a constant used by the author of the technique.²²

D. Statistical analyses

Data are presented as mean $\pm$ S.D. of animals (n = 6) and tested for homoscedasticity by Bartlett test. Homogeneous data were analyzed by ANOVA and Tuckey-Kramer Test in multiple posterior comparisons. Chi-square test was used

evaluate differences in pre-implantation loss and p-values < 0.05 were considered significant.

III. RESULTS AND DISCUSSION

Xi et al.,²³ reports that mushrooms with high antioxidant activity make them frequently recommended for diabetic patients and especially that with phenolic compounds and β -glucans because they are able to reduce oxidative stress²⁴. The nutritional characterization of *Lentinula edodes* indicates that the mushroom samples provided by Yuri Mushrooms presented β -glucans (0.76 g/kg of mushroom), and phenolic compounds (1.61 ± 0.13 mg of gallic acid / g dry sample), indicating that this food has antioxidant potential. In addition, this mushroom presented: moisture (7.3 - 7.5%), minerals (5.4 - 5.8%), lipids (2.3 - 3.1%), proteins (20.3 - 21.5%)

Reproductive Performance of Female Rats

The administration of STZ at the dose of 80 mg/kg was toxic on the pre-implantation parameter of rats at the beginning of gestation. However, in the DLe-100 and DLe-200 groups a reduction of these pre-implantation losses was observed in relation to the pre-implantation loss: CS - 3.18%, DS - 100%, DLe-100 - 85%, DLe-200 - 90%, $p < \text{Chi-square Test}$). According to Lourenço²⁵ the interpretation of changes in reproductive rates can identify the period in which reproductive toxic effects have been established, altering the female reproductive physiology. The pre-implantation phase, from the 1st to the 6th day post-fertilization in rats, constitutes the relation between the number of oocytes released and those that after fertilization could not be implanted in the uterus²⁶. Segundo Rogers; Kavlock,²⁷ This stage is characterized by the presence of dividing totipotent cells and the exposure of the progenitor to a toxic agent during gestation may prevent the implantation of blastocysts in the uterus or result in a number

of changes in the development of the embryos. In this study, doses of 100 and 200 mg/kg/day of *Lentinula edodes* administered in GDM-STZ rats reduced pre-implantation loss rates by 10-15% when compared to those of DS animals. The studies carried out by Frizo et al.²⁸ emphasize the protective effects of *Lentinula edodes* when associated with methotrexate, reducing the pre-implantation losses promoted by this drug.

A. Effects of *Lentinula edodes* on the hematological parameters of rats with GMD-STZ

Martin⁵ reports that *Lentinula edodes* may be a protective agent in chronic diseases by altering inflammatory processes developed by pathologies such as Diabetes Mellitus. This is due, in part, to its antioxidant and immunomodulatory activity, since oxidative stress and inflammation are characteristic of diabetes.

In the clinical management of chronic pathologies, such as DM, the hemogram is an important parameter that provides essential data on the evolution of these pathologies²⁹. In GDM, hematological parameters are often changed, indicating a reduction in the microcirculatory flow, with consequent cellular oxygen deficiency, which may lead to a reduction in nutrient supply, prevent gestational development^{30, 31}. In addition, changes in the immune system may occur in the presence of ketone bodies, resulting in changes in lipid metabolism in diabetic patients.³²

The table 1 shows the results of hematological evaluation in GDM-STZ animals. The DS group presented increased hematocrit ($F = 6.075$, $p = 0.0014$), and decreased platelets ($F = 2.0$, $p = 0.05$), monocytes ($F = 5.576$, $p = 0.0007$) and neutrophils ($F = 3.093$, $p = 0.05$), in relation to CS.

Exposure to *Lentinula edodes* at the dose of 200 mg/kg (DLe-200) was able to normalize platelet and monocyte parameters altered by GDM-STZ when compared to the non-diabetic group (CS). These results corroborate with those performed by Li et al.³³ where the effect of the treatment with *Lentinula edodes* showed changes on blood viscosity and in the morphological of red blood cells with an increase in viscosity and a reduction in blood deformities.

[insert table 1]

B. Effects of *Lentinula edodes* on the biochemical parameters of rats with GDM-STZ

Kabir et al.³⁴ studying the effects of *Lentinula edodes* in hypertensive rats with a diet containing 5% of this mushroom, showed a decrease in VLDL and HDL-Chol, suggesting that this mushroom can be used in the treatment of dyslipidemias. *Lentinula edodes* have shown health benefits, including reduction of plasma lipids and prevention of body weight. Handayani et al.³⁵ showed that a diet enriched with 6% of this mushroom was able to reduce plasma triglyceride in rats exposed to a high-fat diet.

The hepatoprotective effect of compounds derived from *Lentinula edodes* mycelium, such as polyphenols, syringic acid, and vanillic acid - produced by leptin-degrading peroxidase - was described after exposure to dimethylnitrosamine³⁶ our de CCl₄.³⁷ In both studies, antifibrotic activity and hepatocyte viability were observed. According to with Hazama et al.³⁸, The mechanism of insulin resistance in GDM promotes increases in lipid peroxidation, reducing in carbohydrate oxidation and accumulation of fat in hepatocytes. This can indicate the appearance of liver diseases with consequent elevation of liver enzymes such as ALT and AST.

Streptozotocin is an antimicrobial agent that has been used for several decades as an inducer of diabetes in experimental animals, and that also show the effect as a β -cytotoxic pancreatic drug, hepatotoxicity and nephrotoxic effects.^{39,40}

Table 2 shows the biochemical dosages ALT, AST, creatinine, urea, glucose, calcium, total cholesterol, HDL-Chol and triacylglycerol's performed in the serum of the rats. The results indicate that the DS group presented an increase in ALT levels ($F = 39.36$, $p < 0.0001$), AST ($F = 10.46$, $p < 0.0024$), urea ($F = 4,908$ $p < 0.0010$), glucose ($F = 33.72$, $P < 0.0001$) and triglycerides ($F = 5.420$, $p < 0.0078$), and reduction of HDL-Chol levels ($F = 6.79$, $p < 0.0023$) in relation to CS group, expected results from exposure to STZ.^{39,40} The exposure to *Lentinula edodes* at a dose of 200 mg/kg (DLe-200) was able to reduce ALT levels ($F = 39.36$, $p < 0.0001$), urea ($F = 4,908$ $p < 0.0010$), glucose ($F = 33.72$, $p < 0.0001$), triglycerides ($F = 33.72$, $p < 0.0001$) when compared to the DS group, but were not able to change these levels when compared CS. The dose 100 mg/kg (DLe-100) was able to reduce only urea and glucose levels when compared to the DS group. These both doses were not able to increase HDL-Chol levels when compared to the CS group. The biochemical evaluation indicates that *Lentinula edodes* has a protective effect on liver enzymes and renal function induced by STZ, but it has not been able to reverse the damage caused by this drug.

Spim et al.⁴¹ showed that associating the daily consumption of *Lentinula edodes* with a high-fat diet, promoted the normalization of serum ALT and AST levels, reducing urea and glucose levels promoted by the high fat diet. *Lentinula edodes* reduced the levels of TBARS, avoiding the oxidation of the fatty acids. These results corroborate with findings of Zhu et al.,⁴² who quantified the polysaccharides of *Lentinula edodes* and correlate their effects on total serum cholesterol, triglycerides,

low-density lipoproteins, and high-density lipoprotein. Levels of lipid peroxidation in the liver and increased activity of antioxidant enzymes in mice exposed to diet rich cholesterol.

[insert table 2]

Yoon et al.,⁴³ when using *Lentinula edodes* fruiting bodies as dietary supplementation (5%) observed a plasma reduction of total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein (LDL-Chol), total lipids, phospholipids, and high density lipoprotein (HDL-Chol). In addition was also able to reduce the weight of rats with hypercholesterolemia without altering blood levels of plasma albumin, total bilirubin, direct bilirubin, creatinine, urea, uric acid, glucose, total protein, calcium, sodium, potassium, chloride, inorganic phosphate, Magnesium. These authors suggest that *Lentinula edodes* could be recommended as a natural dietary substance for lowering cholesterol.

B. Effects of Lentinula edodes on the parameters of oxidative stress in rats with GMD-STZ

Table 3 shows the oxidative parameters GSH, Catalase and TBARS. The results indicate that there was a reduction of GSH in the diabetic groups about the non-diabetic control group ($F = 19.3$, $p < 0.0001$). On the other hand, an increase of the catalase in the diabetic groups was observed concerning the non-diabetic control group. However, in the DLe-200 group this enzyme was decreased about the DS and DLe-100 groups ($F = 14.04$, $p = 0.0001$). Regarding the TBARS parameter, there was no difference between groups ($F = 2.12$, $p = 0.1003$).

[insert table 3]

GSH is the main thiol involved in cellular antioxidant defense against the toxic effects of reactive oxygen species, acting as free radical scavenger.⁴⁴ In diabetes mellitus, there is an excessive production of free radicals, especially induced by hyperglycemia,⁴⁵ causing GSH to act in the detoxification of free radicals, causing a decrease in its concentration, a fact observed in rats of the diabetic group.

According to Pinto⁴⁶ the increase of catalase is due to a mechanism regulated at the transcriptional level. An increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species in the organism promotes the dissociation of the Keap1-Nrf₂ complex in the cytoplasm, causing the Nrf₂ to become activated, being transported to the nucleus. This transcription factor binds to antioxidant response elements in the promoter region of genes that transcribe endogenous antioxidant enzymes, such as catalase. This mechanism could explain the increased catalase activity in this study. The increased activity of catalase could be a defense mechanism of the organism, activated by the increase of the oxidants induced by streptozotocin.

IV. CONCLUSIONS

We conclude that *Lentinula edodes*, at daily doses of 100 and 200 mg/kg, has a protective effect on the reproductive capacity of rats with severe GMD, and assists in the normalization of hematological, biochemical and redox changes. However, it is not capable of totally reversing the toxic effects of streptozotocin.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge the FAPESP (Process 2015/24566-9 and 2013/05765-5), Finep (Process 01.10.0659.00), PROSUP-CAPES and PROBIC-UNISO for fellowships and to Post Graduate Program in Pharmaceuticals Sciences from University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil.

REFERENCES

1. Zhao Z, Zhang S, Wang S, Yao Z, Zho H, Tao S, Tao L. Exposure limits for ultra-short wave radiation in work environments. *Rev Environ Health*. 1994;10(3-4):217-20.
2. Soares AA, de Oliveira AL, Sá-Nakanishi AB, Comar JF, Rampazzo AP, Vicentini FA, Natali MR, Gomes da Costa SM, Bracht A, Peralta RM. Effects of an *Agaricus blazei* aqueous extract pretreatment on paracetamol-induced brain and liver injury in rats. *Biomed Res Int*. 2013.
3. Spelman K, Depoix D, McCray M, Mouray E, Grellier P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate in vitro and in vivo antimalarial activity. *Phytother Res*. 2011;25(7):1098-101.
4. A Ajith T, K Janardhanan K. Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;40(3):157-62.
5. Martin KR. Both common and specialty mushrooms inhibit adhesion molecule expression and in vitro binding of monocytes to human aortic endothelial cells in a pro-inflammatory environment. *Nutr J*. 2010;16;9:29.
6. Chandra R, Moore JW. The surgical options and management of intestinal Crohn's disease. *Indian J Surg*. 2011;73(6):432-8.
7. Wang L, Wang C, Gao X, Xu N, Lin L, Zhao H, Jia S, Jia L. Purification, characterization and anti-aging capacity of mycelia zinc polysaccharide by *Lentinus edodes* SD-08. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:111.

8. Menghini L, Leporini L, Scanu N, Pintore G, Ferrante C, Recinella L, Orlando G, Vacca M, Brunetti L. A multiherbal formulation influencing immune response in vitro. *Minerva Med.* 2012;103(1):13-21.
9. Menghini L, Leporini L, Pintore G, Ferrante C, Recinella L, Orlando G, Vacca M, Brunetti L. A natural formulation (imoviral™) increases macrophage resistance to LPS-induced oxidative and inflammatory stress in vitro. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014; 28(4):775-82.
10. Andrade MCN, Minhoni MTA, Zied DC. Nutritional evaluation of shiitake mushroom [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] in function of the strain and type of cultivated eucalyptus. *Food Sci. Technol.* 2008;28(4):916-921.
11. Regula J, Krejpcio Z, Staniek H. Bioavailability of iron from cereal products enriched with dried shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) as determined by iron regeneration efficacy method in female rats. *J Med Food.* 2010;(5):1189-94.
12. Carneiro AA, Ferreira IC, Dueñas M, Barros L, da Silva R, Gomes E, Santos-Buelga C. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chem.* 2013;138(4):2168-73.
13. Rop O, Mlcek J, Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr Rev.* 2009;67(11):624-31.

14. Reverberi M, Fabbri AA, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Fanelli C. Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;69(2):207-15.
15. You R, Wang K, Liu J, Liu M, Luo L, Zhang Y. A comparison study between different molecular weight polysaccharides derived from *Lentinus edodes* and their antioxidant activities in vivo. Pharm Biol. 2011;49(12):1298-305.
16. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Vegetals as natural sources of antioxidants. Quim Nova. 2009;32(3) 689-702.
17. IAL - Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
18. Gerenutti M, Del Fiol FS, Groppo FC. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. Pharmazie. 2006;61(1):79-80.
19. Toma A, Makonnen E, Mekonnen Y, Debella A, Adisakwattana S. Antidiabetic activities of aqueous ethanol and n-butanol fraction of *Moringa stenopetala* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. BMC Complement Altern Med. 2015; 15:242.
20. Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MV, Padovani CR, Calderon IM. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2008; 116(1):131-
21. Sedlak, J., Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Analytical Biochemistry. 1968;25,192–205.

22. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
23. Xi, H. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers.* 2008;72(1), 67-74.
24. Wu N, Xu Z. Sequential extractions: A new way for protein quantification data from peanut allergens. *Anal Biochem.* 2015;484:31-36.
25. Lourenço, A. C. S., Miguel, K. L., Sensiate, L. A., & Salles, M. J. S. (2009). Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2009;11(4), 407-413.
26. Almeida FC, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol.* 2000;73(1-2):53-60.
27. Rogers, J. M.; Kavlock, R. J. Developmental toxicology. *In: Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons.* KLAASEN, C. D. (Ed.): 7th ed. McGraw-Hill, 301-331, 2007.
28. Frizo, Í., Pickler, T. B., Grotto, D., & Gerenutti, M. Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake). *Reproductive Toxicology.* 2014; 48, 25.
29. Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos CJ, Garcia SC, Mergler D, Barbosa F Jr. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ.* 2010;408(4):806-11.

30. Vilaça R, Mendes V, Mendes MV, Carreto L, Amorim MA, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V. Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. *PLoS One*. 2012;7(9).
31. Pardo-Giménez A, Catalán L, Carrasco J, Álvarez-Ortí M, Zied D, Pardo J. Effect of supplementing crop substrate with defatted pistachio meal on *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* production. *J Sci Food Agric*. 2016; 96(11):3838-45.
32. Chung-Yuan Chen, Mei-Yueh Lee, Kun-Der Lin, Wei-Hao Hsu, Yaun-Jinn Lee, Pi-Jung Hsiao and Shyi-Jang Shin. Diabetes Mellitus Increases Severity of Thrombocytopenia in Dengue-Infected Patients *Int J Mol Sci*. 2015; 16(2): 3820–3830.
33. Li X, Zhang H, Xu H. Analysis of chemical components of shiitake polysaccharides and its anti-fatigue effect under vibration. *Int J Biol Macromol*. 2009;45(4):377-80.
34. Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1987;5:341-6.
35. Handayani D, Meyer BJ, Chen J, Brown SH, Mitchell TW, Huang XF. A high-dose Shiitake mushroom increases hepatic accumulation of triacylglycerol in rats fed a high-fat diet: underlying mechanism. *Nutrients*. 2014;6(2):650-62.
36. Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Nakamura R, Hayashi S, Kodama D, Kawase M, Yagi K. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(12):1957-60.

37. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(6):983-7.
38. Hazama S, Watanabe S, Ohashi M, Yagi M, Suzuki M, Matsuda K, Yamamoto T, Suga Y, Suga T, Nakazawa S, Oka M. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(7):2611-7.
39. Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, Sinzato YK, Bueno A, Calderon IM, Rudge MV. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:819065. doi: 10.1155/2014/819065. Epub 2014 May 27.
40. Kanwar YS, Nayak B, Lin S, Akagi S, Xie P, Wada J, Chugh SS, Danesh FR. Hyperglycemia: its imminent effects on mammalian nephrogenesis. *Pediatr Nephrol.* Jul; 2005;20(7):858-866.
41. Spim SR, de Oliveira BG, Leite FG, Gerenutti M, Grotto D. Effects of Lentinula edodes consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. *Eur J Nutr.* 2016.
42. Zhu M, Nie P, Liang Y, Wang B. Optimizing conditions of polysaccharide extraction from Shiitake mushroom using response surface methodology and its regulating lipid metabolism. *Carbohydr Polym.* 2013; 95(2):644-8.

43. Yoon KN, Alam N, Lee JS, Cho HJ, Kim HY, Shim MJ, Lee MW, Lee TS. Antihyperlipidemic Effect of Dietary *Lentinus edodes* on Plasma, Feces and Hepatic Tissues in Hypercholesterolemic Rats. *Mycobiology*. 2011;39:96-102.
44. Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Marinero P, Moral O, Manzanar I, Rodriguez E. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Journal of Chromatography, A* 1997;778(1-2): 347-353.
45. Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol*.2009; 9:771-779.
46. Pinto, R. B. (2015). Nrf2 como potencial alvo farmacológico no tratamento da depressão e da dor neuropática associada ao diabetes.
47. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid reaction. *Analyt Biochem*.1979; 95:351-358.

Table 1 – Hematological parameters of pregnant rats treated with *Lentinula edodes*.

Parameters	Groups			
	Non Diabetics		GDM-STZ	
	CS	DS	DLe-100	DLe-200
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	6.23 ± 0.66	6.77 ± 0.10	6.82 ± 0.03	6.42 ± 0.26
Hemoglobin (g/dL)	11.73 ± 1.55	12.88 ± 0.21	12.54 ± 0.14	12.32 ± 0.56
Hematocrit (%)	37.3 ± 3.46	$43.3 \pm 3.11^*$	$41.46 \pm 0.63^*$	$41.92 \pm 1.69^*$
MCV (fL)	60.00 ± 0.56	64.28 ± 3.39	60.84 ± 0.63	65.27 ± 0.07
MCH (pg)	18.80 ± 0.49	19.10 ± 0.00	18.42 ± 0.21	19.70 ± 0.14
MCHC (g/dL)	31.43 ± 1.20	29.75 ± 1.62	30.28 ± 0.56	29.42 ± 0.14
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	773.00 ± 14.14	$692.5 \pm 62.63^*$	$560.33 \pm 31.62^*$	751.00 ± 27.68
Leukocyte ($10^3/\mu\text{L}$)	8.48 ± 0.33	6.54 ± 1.50	6.85 ± 1.21	5.98 ± 1.06
Lymphocyte ($10^3/\mu\text{L}$)	6.08 ± 0.53	4.92 ± 1.93	4.90 ± 0.85	4.30 ± 0.53
Monocyte ($10^3/\mu\text{L}$)	0.58 ± 0.05	$0.32 \pm 0.04^*$	$0.39 \pm 0.06^*$	$0.65 \pm 0.04^{\text{ab}}$
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	1.74 ± 0.03	$0.41 \pm 0.20^*$	$1,16 \pm 0.28$	1.01 ± 0.51
Eosinophil ($10^3/\mu\text{L}$)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.03

CS (0.9% saline solution), DS (Diabetic - 0.9% saline solution), DLe-100 (Diabetic - *Lentinula edodes* 100 mg/kg/day), DLe-200 (Diabetic - *Lentinula edodes* 200 mg/kg/day). RBC (Red Blood Cells), MCV (Mean Corpuscular Volume), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration). Data are presented as mean $\pm$ S (n = 6). *p<0.05 in comparison to CS group, ^acomparison to DS group, ^acomparison to DLe-100 group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Table 2 – Serum biochemical outcomes of pregnant rats treated with *Lentinula edodes*

Parameters	Groups			
	Non Diabtetics		GDM-STZ	
	CS	DS	DLe-100	DLe- 200
ALT (U/L)	60.46 ± 16.05	585.60 ± 44.54*	454.73± 99,06*	311.30 ± 94.42* ^a
AST (U/L)	151.30 ± 11.41	330.23 ± 13.12*	404.60 ± 16.85*	303.80 ± 28.40*
Creatinine (mg/dL)	0.26 ± 0.00	0.29 ± 0.13	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.03
Urea (mg/dL)	40.36 ± 3.01	86.70 ± 4.60*	62.36 ± 1.27* ^a	69.99 ± 1.21* ^a
Glucose (mg/dL)	144.04 ± 18.05	713.15 ± 13.61*	563.00 ± 62.52* ^a	511.42 ± 28.16* ^a
Calcium (mmol/L)	2.22 ± 0.09	2.40 ± 0.07	2.37 ± 0.09	2.49 ± 0.03
Cholesterol (mg/dL)	66.96 ± 12.38	52.77 ± 15.08	49.42 ± 22.04	56.48 ± 10.33
HDL-Chol (mg/dL)	38.12 ± 1.80	32.81 ± 3.47*	25.28 ± 1.65* ^a	32.26 ± 1.55*
Triglycerides (mg/dL)	127.85 ± 4.62	298.81 ± 3.51*	276.73 ± 14.07*	238.01 ± 10.09* ^a

CS (0.9% saline solution), DS (Diabetic - 0.9% saline solution), DLe-100 (Diabetic + *Lentinula edodes* 100 mg/kg/day), DLe-200 (Diabetic + *Lentinula edodes* 200 mg/kg/day). AST (aminotransferase de aspartate), ALT (aminotransferase de alanine), HDL-Chol (high-density lipoproteins). Data are presented as mean ± S (n = 6). *p<0.05 in comparison to CS group, ^acomparison to DS group, ^acomparison to DLe-100 group, ^bcomparison to DLe-200 group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Table 3 – Activity level of catalase, reduced glutathione (GSH), and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of pregnant rats treated with *Lentinula edodes*

Parameters	Groups			
	Non Diabetics		GDM-STZ	
	CS	DS	DLe-100	DLe-200
Catalase k/min/mg	0.19 ± 0.09	0.64 ± 0.19*	0.61 ± 0.06*	0.26 ± 0.01* ^a
GSH µmol/g	0.26 ± 0,02	0.16 ± 0.01*	0.16 ± 0.04*	0.13 ± 0.01*
TBARS µmol/g	7.17 ± 1.58	7.55 ± 0.94	6.23 ± 0.73	6.66 ± 1.52

CS (0.9% saline solution), DS (Diabetic - 0.9% saline solution), DLe-100 (Diabetic + *Lentinula edodes* 100 mg/kg/day), DLe-200 (Diabetic + *Lentinula edodes* 200 mg/kg/day). Data are presented as mean ± S (n = 6). *p<0.05 in comparison to CS group, ^acomparison to DS group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes estudos reportaram modelos de utilização da estreptozotocina para a indução do diabetes mellitus gestacional. Embora existam grandes diferenças metodológicas entre os protocolos empregados, podemos concluir, que a DMG-STZ ainda é um bom modelo para os estudos dos efeitos da hiperglicemia sobre os conceptos.

O *Lentinula edodes* nas doses utilizadas, não apresentou efeitos tóxicos sobre a mãe e mostrou possuir efeito protetor sobre os parâmetros de pré-implantação na DMG-STZ. Entretanto não foi capaz de reverter os efeitos deletérios causados pelo diabetes na gestação.

‘ANEXO A – Documento aprovação CEUA

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO

PARECER

Protocolo nº 48/2015
Interessado (a): Marli Gerenutti
Orientador (a): Marli Gerenutti
Título do Projeto: Ensaios Pré-clínicos com o <i>Lentinula adodes</i> (Shiitake) no Tratamento de Diabetes Gestacional.
Título do Experimento: o mesmo

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

☒ **APROVADO.**

☐ **APROVADO com RECOMENDAÇÃO**, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

☐ **COM PENDÊNCIA**, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

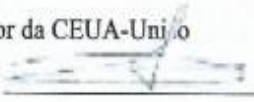
☐ **REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

--

Nome: Renata de Lima

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 25/05/2015

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

ANEXO B – Atestado de sanidade animal



Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. - EPP
CNPJ (MF) 08.440.012/0001-40 - INSC. EST.: 513.020.551.118
CRMV - SP - 17018/J - CNEPICONCEA Nº 01.0264.2014

Paulínia, 02 de fevereiro de 2016.

ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL

Atesto para os devidos fins que os Ratos Wistar procedentes deste estabelecimento, e constantes na Nota fiscal Eletrônica 003913 estão em perfeitas condições de saúde e livres de doenças infecto-contagiosas, cumprindo-se, dessa forma, o que determinam os dispositivos legais vigentes, no que se referem às exigências sanitárias para o deslocamento dos animais.

Outrossim, informo que os referidos animais são provenientes de matrizes igualmente saudáveis e isentas de quaisquer tipos de tratamento medicamentoso ou por meio de vacinas.

Atenciosamente,

Devanir Perecini
Médico Veterinário
CRMV-SP 32825

ANEXO C - Certificados



Certificamos que **BIANCA HESSEL MASCHIO** participou do **1er Encuentro Internacional de Cooperación Científico-Académica**, realizado na Universidade de Sorocaba - Uniso, no dia 12 de junho de 2015, totalizando 04 horas.

Sorocaba, 12 de junho de 2015.

Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes
 Organizadora do Evento

Coord. do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas





Conferência
Internacional
em Toxicologia

Fármacos no Ambiente: Estratégias de
avaliação dos efeitos de fármacos de
utilização humana em peixes

Certificado

Certificamos que **BIANCA HESSEL MASCHIO** participou da Conferência Internacional em Toxicologia, realizada na Universidade de Sorocaba - Uniso, em Sorocaba-SP, Brasil, no dia 24 de fevereiro de 2016, com carga horária de 04 horas.

Sorocaba, 24 de fevereiro de 2016.


Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes
Coordenadora do Mestrado
em Ciências Farmacêuticas


Prof. Dr. Daniel Bertoli Gonçalves
Coordenador do Mestrado
em Processos Tecnológicos e Ambientais




VIII SICOG

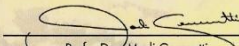
VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL
VII SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS

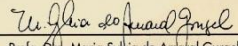
8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL
7th NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS

Certificado

Certificamos que o trabalho **REVISÃO CRÍTICA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DO *Agaricus blazei***, de autoria de **Antonio Ademir Poles Junior, Bianca Hessel Maschio e Sara Rosicler Vieira Spim**, foi apresentado em formato de pôster durante o VIII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil / VII Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, realizado na Universidade de Sorocaba, em Sorocaba-SP, Brasil, no período de 18 a 22 de agosto de 2015.

Sorocaba, 22 de Agosto de 2015.


Profa. Dra. Mari L. Geronutti
Presidente do VIII SICOG
Coordenadora do Comitê Científico


Profa. Dra. Maria Syllia do Amaral Gurgel
Vice-Presidente do VIII SICOG
Membro do Comitê Científico







Declaração



Declaro que **Bianca Hessel Maschio** participou do evento: **II Seminário Internacional sobre Carreira Docente nas Profissões da Saúde**, realizado no dia 26 de Maio de 2015, com duração de 8 horas, na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 26 de Maio de 2015.


Prof. Dra. Eliana Mariorano Amaral
Coordenadora do Programa Pro-Ensino 2036/2010



II International workshop in rational use of medicines

Integrating drug safety researches and evidence based medicine

Certificado

Certificamos que **BIANCA HESSEL MASCHIO** participou do "II International workshop in rational use of medicines", realizado na Universidade de Sorocaba - Uniso, em Sorocaba-SP, Brasil, no dia 21 de outubro de 2015, com carga horária de 04 horas.

Sorocaba, 21 de outubro de 2015.


Prof. Dra. Luciane Cruz Lopes
Organizadora do Evento


Prof. Dr. Silvio Barberato Filho
Coord. do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

 Universidade de Sorocaba
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



UNISO

*Certificamos que **Profa. Marli Gerenutti** (orientadora), **Prof. Antônio Ademar Poles Júnior** e **Profa. Bianca Hessel Maschio** participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III da aluna **Améris Letícia Foramiglio** intitulado: **“INCORPORAÇÃO DE EXTRATO SECO AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DE ganoderma lucidum EM GEL DE FIBROÍNA DERIVADA DE Bombyx mori”** ocorrida no dia 04/12/2015, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*

Sorocaba, 04 de dezembro de 2015

*Prof. M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia*