

Estudo do extrato de *Ginkgo biloba* na prevenção de malformações em recém-nascidos de ratas diabéticas

Sinzato, S., Almeida, F. G., Volpato, T. G., Calderon, I. M. P.; Rudge, M.V. C.

Dept^o. de Ginecologia e Obstetrícia/UNESP/Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Jr., s/n, CEP 18618-000, Botucatu/SP. Correspondência para Gustavo Tadeu Volpato – e-mail: gtvolpato@yahoo.com

RESUMO: Gestantes com diabetes mellitus (pré-existente ou gestacional) desenvolvem alterações metabólicas, que podem ameaçar o bem-estar fetal e provocar anomalias e/ou malformações. Em animais portadores de diabetes induzido experimentalmente, o tratamento com antioxidantes tem melhorado o desenvolvimento embrionário. Vários trabalhos têm demonstrado que o extrato de *Ginkgo biloba* apresenta efeitos antioxidantes e, neste estudo, utilizou-se uma das formulações do extrato de *G. biloba* (EGb761) - Tebonin, na dose de 200 mg/Kg/dia, administrado durante toda a prenhez a ratas diabéticas, como objetivo de avaliar o efeito do tratamento com EGb761 sobre a incidência de anomalias e/ou malformações dos recém-nascidos. As ratas foram induzidas ao diabetes pela infusão intravenosa de *Streptozotocin*, acasaladas e, após confirmada a prenhez, foram divididas em dois grupos: Controle (água) e Tratado (*G. biloba*). A cesárea foi realizada no 21^o dia, quando os recém-nascidos foram mortos e processados para análise das anomalias e/ou malformações. Os resultados demonstraram que os dois grupos apresentaram ausência de anomalias e de malformações externas; elevada frequência de anomalias esqueléticas e de malformações viscerais, com menor frequência de anomalias viscerais e de malformações esqueléticas. Estes índices não confirmaram diferença estatística e, portanto, independeram do tratamento com o EGb761. Conclui-se que a dose de 200 mg/Kg/dia do extrato de *Ginkgo biloba*, administrada durante a prenhez de ratas, não foi eficaz na prevenção das anomalias e/ou malformações relacionadas ao diabetes.

Palavras-chaves: diabetes gestacional, *Ginkgo biloba*, prenhez, plantas medicinais, rato

ABSTRACT: Study of *Ginkgo biloba* extract to prevent the offspring malformations of diabetic female rats. The pregnant women presenting Diabetes mellitus develop metabolic alterations, that may cause damage to the fetal well-being and provoke anomalies and/or malformations. The antioxidant treatment has improved the embryonic development from streptozotocin diabetic rats. Several studies have shown that a *Ginkgo biloba* extract presents antioxidant effects and, in the present study, one of the *G. biloba* extract formulations was used (EGb761) – Tebonin (200 mg/Kg/day), given to the diabetic pregnant female rats. The aim was to evaluate the effect of the EGb761 treatment on the of anomalies and/or malformations incidence of the offspring. Diabetes was induced in female rats using streptozotocin in a dose of 40 mg/kg. The rats were mated, and the pregnant animals were divided in two groups: Control (water) and experimental (*G. biloba*). At day 21 of pregnancy, the rats were killed, and their fetuses were analyzed and processed for anomalies and/or malformations incidence. The results demonstrated that control and experimental groups presented no external anomalies and malformations; increased incidence of skeletal anomalies and of visceral malformations, and lower rate of visceral anomalies and skeletal malformations. These data confirm no statistical difference and, therefore, EGb761 treatment did not cause changes. Thus, a dose of 200 mg/Kg/day of a *Ginkgo biloba* extract given during the pregnancy rat was ineffective in the prevention of the anomalies and/or malformations related to the diabetes.

Key words: diabetes, *Ginkgo biloba*, pregnancy, malformations and rat

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é definido como síndrome que inclui alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas decorrentes da deficiência, absoluta ou relativa, na produção e/ou liberação de insulina. Existem dois tipos principais de diabetes – o diabetes tipo 1, também conhecido como diabetes mellitus dependente de insulina e o diabetes tipo 2, que se instala na idade adulta e é caracterizado pela não insulino-dependência (Sherwin *et al.*, 1995).

Recebido para publicação em 30/11/02
e aceito para publicação em 20/05/03.

Durante o período gestacional, mais precisamente no terceiro trimestre da gestação, pode-se observar uma redução de 50 a 70% na ação da insulina, indicando que este último estágio da gestação é marcado pela resistência à ação da insulina. Na gestação normal, as células beta (b) pancreáticas respondem à resistência à insulina aumentando a produção deste hormônio, tanto em condições basais como após estímulo de glicose. Em gestantes com falta de reserva funcional pancreática, instala-se um terceiro tipo de diabetes, o diabetes gestacional (Buchanan, 1955).

Gestantes com diabetes desenvolvem

alterações metabólicas, que podem ameaçar tanto o bem-estar materno quanto o fetal. Dentre as repercussões fetais destacam-se as malformações, cuja frequência entre filhos de mães diabéticas é duas a três vezes maior que a observada na população geral, sendo estas anormalidades responsáveis por 40% das mortes perinatais. As mais frequentes envolvem o sistema nervoso central, sistema esquelético, o cardiovascular, o trato gastrointestinal e o genito-urinário (Reece & Eriksson, 1995).

O controle rigoroso dos níveis sanguíneos de glicose em mães diabéticas pode reduzir as anomalias e/ou malformações congênitas. Entretanto, mesmo com o controle da hiperglicemia materna, estas alterações ocorrem. Sugere-se uma etiologia multifatorial para a dismorfogênese embrionária nas gestações complicadas pelo diabetes (Reece & Eriksson, 1995).

Em animais portadores de diabetes induzido experimentalmente, o tratamento com diferentes antioxidantes tem melhorado o desenvolvimento embrionário, tanto *in vitro* como *in vivo* (Eriksson & Borg, 1993; Viana *et al.*, 1996; Siman & Eriksson, 1997; Damasceno, 2000). Portanto, sugere-se que radicais livres exerçam um papel central na etiologia das malformações causadas pelo diabetes.

O extrato das folhas de *Ginkgo biloba*, planta da família monotípica Ginkgoaceae, vem sendo utilizado com fins terapêuticos há vários anos. Esta planta é mencionada na farmacopéia tradicional chinesa, empregada no tratamento de asma e bronquite crônica. Nos países ocidentais, extratos padronizados das folhas secas da *G. biloba* são utilizados no tratamento de doenças vasculares periféricas e, de maior importância, na chamada "insuficiência cerebral" (dificuldade de concentração e de memória, confusão mental, falta de energia, ansiedade e tontura, entre outros) (Kleijnen & Knipschild, 1992).

Vários estudos têm demonstrado que o extrato de *G. biloba* apresenta efeitos antioxidantes (Yan *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1995; Oyama *et al.*, 1996). A capacidade antioxidativa do extrato de *G. biloba* foi também confirmada em pacientes com diabetes insulino-dependentes (Balashova & Kubatiev, 1998).

Considerando que a dismorfogênese embrionária na gestação associada ao diabetes pode ocorrer por ação dos radicais livres de oxigênio e que o extrato da planta *G. biloba* tem apresentado efeitos antioxidantes, seria válido estudar a ação desse extrato na prevenção das malformações fetais em gestações complicadas pelo diabetes materno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *G. biloba*, administrado durante toda a prenhez a ratas diabéticas, sobre a incidência de

malformações e/ou anomalias externas e internas (esqueléticas e viscerais) dos recém-nascidos.

MATERIAL E MÉTODO

1. Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar adultas, virgens, com peso aproximado de 200g e ratos da mesma linhagem, adultos, pesando ao redor de 250g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus Universitário de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno forradas com maravalha, no Biotério do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu (Unesp), em ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 24 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Antes do início dos experimentos os animais foram aclimatizados por um período de sete dias e receberam água filtrada e ração *ad libitum*. Após isso, foi verificada e confirmada a normoglicemia de todas as ratas.

2. Drogas, Doses e Vias de Administração

Streptozotocin (STZ – SIGMA Chemical Company, St Louis, MO): 40 mg/kg, via intravenosa (Calderon *et al.*, 1992).

Droga utilizada para tratamento: princípio ativo extraído do extrato de *Ginkgo biloba* EGb 761 (BYK Química – Altana Pharma) conhecido comercialmente como Tebonin: administrado por via oral na dose de 200mg/kg/dia que não resultou em toxicidade materna. A administração foi realizada por *gavage*, uma vez ao dia, durante todo o período de prenhez.

3. Procedimentos Experimentais

Indução do diabetes: Induziu-se experimentalmente pela injeção intravenosa (IV) de STZ, diluído em tampão citrato (0,01M), pH 4,5, na dose de 40 mg/kg de peso, na veia da cauda. Após sete dias, foi avaliada a glicemia para confirmação e determinação da intensidade do diabetes. Foram admitidas ao estudo as ratas com diabetes grave, ou seja, aquelas que apresentaram glicemia plasmática superior a 200 mg/dL (Calderon *et al.*, 1992).

Acasalamento e diagnóstico de prenhez: A partir da confirmação do diabetes grave, as ratas foram distribuídas duas a duas em gaiolas de polietileno, na presença de um rato macho, para acasalamento e permaneceram durante a noite toda. A presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, colhido na manhã seguinte, associada à fase estro do ciclo estral foram indicativos de prenhez. Este dia

foi considerado dia zero da prenhez (Calderon *et al.*, 1992). Confirmada a prenhez, as ratas foram identificadas, sorteadas para a composição dos grupos e mantidas em gaiolas individuais, onde receberam os diferentes tratamentos.

4. Grupos Experimentais: Os animais foram distribuídos em dois grupos:

- **diabético controle:** constituído por ratas prenhes diabéticas, que receberam água filtrada, durante toda a prenhez, em volume semelhante ao administrado no grupo tratado (n=11);

- **diabético tratado:** constituído por ratas prenhes diabéticas, que receberam o extrato de *G. biloba* (EGb 761) durante toda a prenhez (n=14).

5. Avaliação na prenhez

Determinação da glicemia plasmática –

Os níveis de glicose maternos foram determinados em glicosímetro de leitura digital, através de punção da parte distal da cauda para coleta de sangue (1 gota). As glicemias foram realizadas no 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dias de prenhez. Após o nascimento, foi determinada a glicemia dos recém-nascidos pelo mesmo método, coletando-se o *pool* de sangue representativo de cada ninhada (Calderon *et al.*, 1992).

Resolução da prenhez: Na manhã do 21^o dia de prenhez, as ratas foram mortas por deslocamento cervical, realizando-se a laparotomia com exposição dos cornos uterinos, que foram abertos para contagem dos pontos de implantação, pontos de reabsorção e número de fetos vivos e mortos. Na ausência de desenvolvimento fetal ou de pontos de implantações visíveis, o útero foi submetido à técnica de coloração com reativo de Salewski (1964) para determinação dos pontos de implantação.

Avaliação fetal e placentária: Os fetos foram retirados dos cornos uterinos, separados das respectivas placentas, e examinados macroscopicamente para diagnóstico de anomalias e/ou malformações externas. Os pesos fetais foram classificados em pequeno (PIP), adequado (AIP) e grande (GIP) para idade gestacional. As placen-

tas também foram pesadas individualmente e a relação peso placenta/peso fetal definiu o índice placentário de cada grupo experimental (Calderon *et al.*, 1992). Foi considerada malformação quando foram encontradas anormalidades estruturais incompatíveis com a sobrevivência, e foi considerada anomalia quando havia alteração do processo normal do desenvolvimento sem comprometer a função geral ou específica, ou o desenvolvimento pós-natal do indivíduo (Lemonica, 1996). Metade dos fetos de cada ninhada foi submetida à análise de anomalias e/ou malformações esqueléticas e, a outra metade, reservada para análise das anomalias e/ou malformações viscerais.

Para a observação de anomalias e/ou malformações ósseas, os fetos foram diafanizados e corados com alizarina (Staples & Schenell, 1964). Para a observação de anomalias e/ou malformações viscerais, os fetos foram colocados em solução de Bouin, para fixação das estruturas viscerais e descalcificação óssea, e posterior avaliação pelo método de secções seriadas de Wilson (1965). Foi realizada também a contagem dos pontos de ossificação para a determinação do grau de desenvolvimento fetal (Aliverti *et al.*, 1979).

6. Análise Estatística

Para comparação das médias foi utilizado a análise de variância (ANOVA). As porcentagens foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (X^2). Estas análises foram implementadas utilizando-se o programa computacional "Statistical Analysis System" (SAS, 1985). Adotou-se 5% como limite de significância estatística.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Em ambos os grupos experimentais, a glicemia materna manteve-se em níveis elevados, superiores a 200 mg/dL. Não se observou diferença significativa nos níveis glicêmicos maternos entre os grupos experimentais em qualquer período da prenhez. A glicemia dos recém-nascidos também se apresentou elevada em ambos os grupos

Tabela 1 - Médias e respectivos desvios-padrão das glicemias (mg/dL), maternas e dos recém-nascidos, de ratas diabéticas tratadas com água destilada (controle) ou *Ginkgo biloba* (tratado)

	Controle	Tratado
Dia 0 (média ± dp)	398,09 ± 29,25	375,71 ± 62,41
Dia 7 (média ± dp)	389,72 ± 48,48	372,71 ± 66,23
Dia 14 (média ± dp)	414,00 ± 53,49	389,71 ± 50,99
Dia 21 (média ± dp)	372,54 ± 89,80	380,07 ± 67,10
Média glicêmica recém-nascidos	308,91 ± 57,06	297,69 ± 38,46

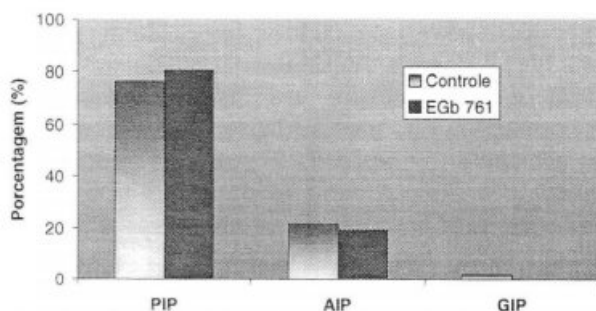
p > 0,05

TABELA 2 - Médias e desvios-padrão dos pesos fetais, peso das placentas e índice placentário de recém-nascidos de ratas diabéticas, tratadas com água destilada (controle) ou *Ginkgo biloba* (tratado).

	Controle	Tratado
Peso fetal (g)	4,09 ± 0,39	3,96 ± 0,57
Peso placentário (g)	0,75 ± 0,15	0,66 ± 0,13
Índice placentário	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,06

* p > 0,05

FIGURA 1 - Porcentagem (%) de fetos com peso pequeno (PIP), adequado (AIP) e grande (GIP) para a idade da prenhez de recém-nascidos de ratas diabéticas tratadas com água destilada (controle) ou *Ginkgo biloba* (EGb 761).



experimentais (Tabela 1).

Na tabela 2 observou-se que não houve diferenças significativas entre os pesos fetais e placentários e índice placentário entre o grupo tratado com água (controle) e o grupo tratado com o extrato de *G. biloba* (tratado).

A maioria dos recém-nascidos do grupo tratado com água (controle) apresentou peso pequeno para a idade de prenhez (PIP-76,47%). Os recém-nascidos (RN) restantes distribuíram-se entre as classes de peso adequado (AIP – 21,57%) e grande (GIP – 1,96%). No grupo tratado com o extrato de *Ginkgo biloba* observou-se esta mesma distribuição entre as classes de RN. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos, relacionando a proporção de RN nas diferentes classes (Figura 1).

Nos grupos experimentais, não foram diagnosticadas malformações ou anomalias externas. O tratamento com o extrato de *Ginkgo biloba* não diminuiu a frequência das malformações e anomalias, tanto viscerais quanto esqueléticas, comparando-se com o grupo tratado com água. A contagem total dos pontos de ossificação foi, em média, 18,59 no grupo controle e 16,96 no grupo tratado, não evidenciando diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

Nas gestações complicadas pelo diabetes materno, as repercussões iniciam-se na pré-concepção, estendem-se por todo o período gravídico e culminam com afecções perinatais, incluindo risco

de morte intra-útero e neonatal. Entre as repercussões maternas e perinatais, destacam-se a descompensação metabólica na segunda metade da gestação, o elevado número de abortos, a macrosomia fetal, as malformações, a hipoglicemia neonatal e o retardo no amadurecimento pulmonar (Rudge, 1995; Rudge, 2000). A chave para prevenção desta cascata de eventos deletérios ao feto e ao recém-nascido é o controle glicêmico materno, com redução da hiperglicemia-hiperinsulinemia fetal (Oh, 1979).

A normoglicemia materna também é responsável pelo bloqueio de alguns agentes envolvidos no estresse oxidativo, reconhecidamente indutor de malformações fetais. Além da hiperglicemia, os radicais livres de oxigênio estão sendo identificados como importantes agentes teratogênicos (Reece *et al.*, 1989; Eriksson & Borg, 1993; Damasceno *et al.*, 2002). Da mesma maneira, tratamento com plantas, de comprovado efeito hipoglicemiante em animais e seres humanos (Srivedya & Periwal, 1995; Rai *et al.*, 1997; Yanardag & Colak, 1998; Volpato *et al.*, 2002) começam a ser investigados na prevenção destas complicações decorrentes do diabetes materno.

Neste trabalho, o tratamento com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) não controlou a glicemia materna. Os níveis glicêmicos mantiveram-se constantes, independentemente da fase (início ou final) da prenhez em ambos os grupos e todos os animais apresentaram níveis compatíveis com diabetes grave (acima de 200 mg/dL) durante a prenhez (Tabela 1).

O tratamento também não influenciou os pesos fetais e placentários e o índice placentário (Tabela 2). Independente da ação do EGb 761, os pesos fetais foram diminuídos, em contraste com os pesos e índices placentários aumentados. Trabalhos anteriores já confirmaram que tais resultados são decorrentes da hiperglicemia intra-uterina. (Calderon *et al.*, 1992, Volpato, 2001).

Alterações placentárias têm sido evidenciadas em mulheres diabéticas, entre elas: o predomínio de endarterite, espessamento das membranas e restrição do espaço intervilo (EIV) (Gewolb *et al.*, 1986; Del Nero *et al.*, 2000), com conseqüente redução na circulação e nas trocas

TABELA 3 - Porcentagem (%) de malformações e/ou anomalias externas e internas (viscerais e esqueléticas) e número total de centros de ossificação em recém-nascidos de ratas diabéticas tratadas com água destilada (controle) ou extrato de *Ginkgo biloba* (tratado).

	Controle	Tratado
Malformações e anomalias externas		
Ninhadas afetadas	0,00	0,00
Recém-nascidos afetados	0,00	0,00
Malformações viscerais		
Ninhadas afetadas	70,00	92,85
Recém-nascidos afetados	53,57	62,78
<i>Hidronefrose</i>	0,00	2,32
<i>Catarata</i>	53,57	60,46
Anomalias viscerais		
Ninhadas afetadas	40,00	71,42
Recém-nascidos afetados	14,28	30,23
<i>Ureter alargado</i>	10,71	16,27
Malformações esqueléticas		
Ninhadas afetadas	0,00	7,42
Recém-nascidos afetados	0,00	4,54
<i>Esternébrio ausente</i>	0,00	4,54
Anomalias esqueléticas		
Ninhadas afetadas	100,00	100,00
Recém-nascidos afetados	90,90	88,63
<i>Esternébrio atrofiado</i>	33,33	61,36
<i>Esternébrio in shaped</i>	51,51	52,27
14 ^a . costela	42,42	50,00
<i>Vértebra bipartida</i>	27,27	25,00
<i>Vértebra em borboleta</i>	42,42	59,09
Total centros de ossificação (média ± dp)*	18,59 ± 2,57	16,96 ± 1,69

* p > 0,05

materno-fetais. As alterações no fluxo sangüíneo total da placenta de ratas diabéticas estão diminuídas em 50% nos últimos dias da prenhez (Eriksson & Jansson, 1984), restringindo a oxigenação e a nutrição do feto. O aumento da placenta seria um mecanismo de compensação, na tentativa de aumentar a superfície de trocas materno-fetais. No entanto, foi demonstrado que este aumento placentário é insuficiente, dificultando a nutrição fetal (Calderon *et al.*, 1992). O elevado valor da relação peso da placenta/peso fetal nos grupos diabéticos confirma esta disfunção.

A classificação do peso dos recém-nascidos em adequado (AIP), pequeno (PIP) e grande (GIP) para a idade de prenhez confirmou, mais uma vez, resultados atribuídos à intensidade

da hiperglicemia no meio intra-uterino (Calderon *et al.*, 1992; Calderon *et al.*, 1999). O tratamento com o extrato de *G. biloba* também não interferiu na distribuição dos recém-nascidos nas diferentes classes, caracterizada pelo predomínio de recém-nascidos PIP (Figura 1).

O diabetes materno é causa conhecida de malformações congênitas, permanecendo nos dias atuais como a responsável pela elevada morbidade e mortalidade perinatal (Becerra *et al.*, 1990). Vários fatores etiológicos são propostos para explicar os defeitos congênitos relacionados ao diabetes. Os conhecimentos atuais apontam para a hiperglicemia como o agente teratogênico primário no diabetes (Reece *et al.*, 1989). Estudos experimentais demonstraram que as anormalidades do processo de desenvolvimento, causado pela hiperglicemia

seriam as responsáveis pelas malformações associadas ao diabetes (Pinter *et al.*, 1986a; Pinter *et al.*, 1986b; Reece *et al.*, 1989; Reece & Eriksson, 1995).

A prevenção das malformações nas ninhadas de ratas diabéticas é obtida pelo controle glicêmico durante a organogênese. Entretanto, resultados semelhantes podem ser observados na restauração do déficit de ácidos graxos essenciais e fosfolípidios (Reece & Coustan, 1995; Consonni, 1999) e pela regulação do excesso de radicais livres, independente do controle glicêmico materno (Eriksson & Borg, 1991).

A normalização do estresse oxidativo poderia ter sido alcançada pelo tratamento das ratas com o EGb 761. Contudo, o tratamento com o *G. biloba* não foi eficaz na prevenção das alterações encontradas. Independente do tratamento, as anomalias e malformações esqueléticas e viscerais foram semelhantes entre os grupos (Tabela 3).

Dentre as malformações viscerais, chama a atenção a elevada proporção de catarata em ambos os grupos. Orham *et al.* (1999) demonstraram que o uso do extrato de *G. biloba* não diminui a formação de catarata após a administração de selenite, um conhecido promotor do estresse oxidativo. Este resultado também foi observado em nosso estudo, no qual 60,46% dos fetos de ratas diabéticas tratadas com o *G biloba* e 53,57% tratado com água apresentaram catarata.

CONCLUSÃO

A dose de 200 mg/Kg/dia do extrato de *Gingko biloba*, administrada durante a prenhez de ratas, não diminuiu a glicemia das ratas diabéticas, ocasionando conseqüentemente, nível glicêmico elevado nos recém-nascidos; não alterou a frequência de recém-nascidos PIP (pequenos para a idade de prenhez), característicos da prenhez de ratas diabéticas e não foi eficaz na prevenção das anomalias e/ou malformações esqueléticas e viscerais relacionadas ao diabetes materno.

Tais resultados sugerem a continuidade da pesquisa para definir a dose ideal do antioxidante na prevenção destas complicações.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALIVERTI, V., BONANOMI, L., GIAVINI, E. et al. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology*, v.20, p.237-42, 1979.
- BALASHOVA, T.S., KUBATIEV, A.A. Effects of tanakan on blood lipid peroxidation and platelet aggregation properties in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Terapevticheskii Arkhiv*, v.70, p.49-54, 1998.
- BECERRA, J.E., KHOURY, M.J., CORDERO, J.F., et al. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics*, v.85, p.1-9, 1990.
- BUCHANAN, T.A. Metabolic changes during normal and diabetic pregnancies. In: REECE, E.A., COUSTAN, D.R. *Diabetes mellitus in pregnancy*: New York: Churchill Livingstone Incorporate, 1995, p.59-77.
- CALDERON, I.M.P., RUDGE, M.V.C., BRASIL, M.A.M., et al. Diabete e gravidez experimental em ratas I. Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.7, p.142-6, 1992.
- CALDERON, I.M.P., RUDGE, M.V.C., RAMOS, M.D., et al. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas: relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intra-uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.21, p.91-8, 1999.
- CONSONNI, M. Efeito da suplementação oral dos ácidos linoléico e gamalinoênico na prenhez de ratas diabéticas. 1999, 198 p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DAMASCENO, D.C. Tratamento de ratas diabéticas prenhes com extrato aquoso de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca): repercussões materno-fetais. 2000. 92p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DAMASCENO, D.C., VOLPATO, G.T., CALDERON, I.M.P., et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Animal Reproduction Science*, v.72, p.235-44, 2002.
- DEL NERO, U., RUDGE, M.V.C., CALDERON I.M.P. Mecanismos de adaptação placentária facilitadores da nutrição fetal. *Femina*, v.28, p.91-3, 2000.
- DUMONT, E., D'ARBIGNY, P., NOUVELOT, A. Protection of polyunsaturated fatty acids against iron-dependent lipid peroxidation by a *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). *Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, v.17, p.83-8, 1995.
- ERIKSSON, U.J., JANSSON, L. Diabetes in pregnancy: decrease placental blood flow and disturbed fetal development in the rat. *Pediatrics Research*, v.18, p.735-8, 1984.
- ERIKSSON, U.J., BORG, L.A.H. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia*, v.34, p.325-31, 1991.
- ERIKSSON, U.J., BORG, L.A.H. Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes*, v. 42, p. 411-9, 1993.
- GEWOLB, I.H., MERIDIAN, W., WARSHAN, J.B., et al. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes*, v.35, p.1264-71, 1986.
- KLEIJNEN, J., KNIPSCHILD, P. *Ginkgo biloba*. *Lancet*, v.340, p.1136-9, 1992.
- LEMONICA, I.P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p.86-94.
- OH, W. Neonatal cone and long-term outcome on infants of diabetic mothers. In: MERKATZ, I.R., ADAM, P.A.J. *The diabetic pregnancy: a perinatal perspective*. New

- York: Grune Statton, 1979. p.195-205.
- ORHAN, H., MAROL, S., HEPSEN, I.F., et al. Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation oxidative stress-related parameters in rats. **Toxicology**, v.139, p.219-32, 1999.
- OYAMA, Y., CHIKAHISA, L., UEHA, T., et al. *Ginkgo biloba* extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. **Brain Research**, v.712, p.349-52, 1996.
- PINTER, E., REECE, E.A., LERANTH, C.Z., et al. Arachidonic acid prevents hyperglycemia associated yolk sac damage and embryopathy: modifications in polyunsaturated fatty acids provide clues for pathogenesis. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v.155, p.691-702, 1986a.
- PINTER, E., REECE, E.A., LERANTH, C.Z., et al. Yolk sac failure in embryopathy due to hyperglycemia: ultrastructural analysis of yolk sac differentiation associated with embryopathy in rat conceptuses under hyperglycemic conditions. **Teratology**, v.33, p.73, 1986b.
- RAI, V., MAN, U.V., IYER, U.M. Effect of *Ocimum sanctum* leaf powder on blood lipoproteins, glycosylated proteins and total amino acids in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Nutrition and Environmental Medicine**, v.7, p.113-8, 1997.
- REECE, E.A., PINTER, E., LERANTH, C., et al. Yolk sac failure in embryopathy due to hyperglycemia: horseradish peroxidase uptake in the assessment of yolk sac function. **Obstetrics and Gynecology**, v.74, p.755-62, 1989.
- REECE, E.A., ERIKSSON, U.J. Congenital malformations: epidemiology, pathogenesis, and experimental methods of induction and prevention. In: REECE, E.A., COUSTAN, D.R. **Diabetes mellitus in Pregnancy**. New York: Churchill Livingstone Incorporate, 1995, p.119-53.
- REECE, E.A., COUSTAN, D.R. **Diabetes mellitus in pregnancy**. New York: Churchill Livingstone, 1995, 455 p.
- RUDGE, M.V.C., CALDERON, I.M.P., RAMOS, M.D., et al. Perspectiva perinatal decorrente do rígido controle pré-natal em gestações complicadas pelo diabetes. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.17, p.26-32, 1995.
- RUDGE, M.V.C., CALDERON, I.M.P., RAMOS, M.D., et al. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and maternal daily hyperglycemia not related to diabetes – a retrospective 10 years analysis. **Gynecology and Obstetrics Investigation**, v.50, p.108-12, 2000.
- SALEWSKY, E. Farbemethode zum markroskopischen nachweis von implantatconstellen am uterus der ratter naunyn schmuderbergs. **Archieve of Pharmacology**, v.247, p.367, 1964.
- SAS Institute Incorporate. **SAS user's guide: statistics**. Cary, NC: SAS Institute Incorporate, 1985. 956 p.
- SIMÁN, C.M., ERIKSSON, U.J. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. **Diabetes**, v.46, p.1054-61, 1997.
- SHERWIN, R.S., TAMBORLANE, W.V., BORG, W.P. Carbohydrate, lipid, and amino acid metabolism in the nonpregnant patient. In: REECE, E.A., COUSTAN, D.R. **Diabetes mellitus in pregnancy**: Churchill Livingstone Incorporate, 1995. p.35-58.
- SRIVEDYA, N., PERIWAL. Diuretic, hypotensive and hypoglycaemic effect of *Phyllanthus amarus*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.33, p.861-4, 1995.
- STAPLES, R.E., SCHENELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v.39, p.61-3, 1964.
- VIANA, M., HERRERA, E., BONET, B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. **Diabetologia**, v.39, p.1041-6, 1996.
- VOLPATO, G.T. **Repercussões maternas, reprodutivas e perinatais do tratamento com o extrato aquoso de folhas de *bauhinia fortificata* (pata-de-vaca) na prenhez de ratas não-diabéticas e diabéticas**. 2001. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- VOLPATO, G.T., DAMASCENO, D.C., CALDERON, I.M.P., et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, p. 35-45, 2002.
- WILSON, J.C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: WILSON, J.C., WARKANI, J. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1965, p.262-327.
- YAN, L.J., DROY-LEFAIX, M.T., PACKER, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.212, p.360-6, 1995.
- YANARDAG, R., COLAK, H. Effect of Chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. **Pharmaceutical and Pharmacology Communication**, v.4, p.309-11, 1998.