

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Érika Leão Ajala Caetano

**EFEITOS DO COGUMELO DO SOL (*Agaricus blazei*) NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL EM RATAS.**

**EFFECTS OF THE SUN MUSHROOM (*Agaricus blazei*) IN DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL IN RATS (GDM-STZ).**

Sorocaba/SP

2019

Erika Leão Ajala Caetano

**EFEITOS DO COGUMELO DO SOL (*Agaricus blazei*) NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL DE RATAS.**

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

2019

Erika Leão Ajala Caetano

**EFEITOS DO COGUMELO SOL (*Agaricus blazei*) NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL DE RATAS.**

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. Raquel de Mendonça Rosa Castro
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Maria Aparecida Lopes da Costa
Universidade de Sorocaba

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, pela sabedoria, pelo acalento e pela certeza de sua presença em todos os momentos de minha vida, sobretudo nos mais difíceis.

À minha orientadora querida, professora Marli Gerenutti, que me acolheu com todo amor e carinho, obrigada pela confiança, por todos os ensinamentos e por ter me conduzido durante todo este trabalho.

A minha mãe e avós, por terem me dado à oportunidade de estar aqui e realizar este trabalho, pelos ensinamentos de toda uma vida e principalmente pelo amor infinito.

A meu companheiro Fabrício Brunhera, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis e de afastamento para a concretização desta etapa em nossas vidas.

Às professoras Maria Aparecida Lopes da Costa e Muriel Siqueira, pela amizade, carinho e gentileza na contribuição durante a realização do trabalho, tão importante em nossas vidas.

A professora Raquel de Mendonça Rosa Castro, pela imensa contribuição neste trabalho, paciência e carinho.

A professora Denise Grotto pela imensa contribuição na finalização do trabalho, carinho e atenção.

À companheira de trabalho e pessoa que se tornou uma grande amiga, Isabella Camargo. Obrigada por todo incentivo, risadas e aventuras que passamos juntas.

À Thaisa Borim Pickler, por compartilhar seus conhecimentos e pela disponibilidade em ajudar.

A CAPES e FAPESP (Processo nº. 2015/24566-9) pelo suporte financeiro neste trabalho.

Enfim, agradecemos a todos que de alguma forma estiveram presentes e puderam nos ajudar na elaboração deste trabalho, fica aqui nossa eterna gratidão.

EPÍGRAFE

“Você pode sonhar criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade.”

(Walt Disney)

RESUMO

Introdução: O aumento das taxas de mortalidade materna e perinatal estão associados ao número crescente de diabetes mellitus gestacional (GDM). Mães diabéticas que não recebem tratamento durante a gravidez apresentam maiores chances de terem filhos com problemas cardíacos, respiratórios, icterícia, episódios de hipoglicemia após parto e ainda morte uterina. A prevenção e o tratamento do GDM são de extrema importância, sendo a terapia nutricional uma das principais formas para o controle glicêmico adequado. O interesse no cogumelo *Agaricus blazei* vem aumentando ao longo dos anos devido a seus efeitos antidiabéticos, que estão relacionados a seu valor nutricional e potenciais ações terapêuticas. A presença de β -glucanas e compostos fenólicos indicam que este cogumelo pode ser usado como suplemento nutricional com alto poder antioxidante. **Objetivo:** Avaliar, por meio de testes pré-clínicos, a administração diária de *Agaricus blazei* no diabetes mellitus gestacional de ratas induzido por estreptozotocina (GDM-STZ), considerando-se suas potencialidades como alimento funcional. **Métodos:** Foram empregadas técnicas de avaliação perinatal com a exposição materna diária ao pó liofilizado e reconstituído do *Agaricus blazei* antes (GDM+Ab_b) e após (GDM+Ab_a) a indução do diabetes gestacional com estreptozotocina (40 mg/kg, intravenosa) no 8º dia de gestação. Foram realizados: (1) caracterização do cogumelo; (2) acompanhamento diário do peso; (3) teste materno de tolerância oral à glicose; (4) hemograma materno completo; (5) avaliações bioquímicas e de estresse oxidativo de sangue materno e avaliação bioquímica de líquido amniótico; (6) dosagens de insulina; (7) avaliação da capacidade reprodutiva; (8) avaliações do desenvolvimento embriofetal; (9) avaliação histológica da placenta. **Resultados:** o *Agaricus blazei* não reduziu a hiperglicemia severa da mãe-conceito; apresentou boa atividade antioxidante melhorando alguns parâmetros de estresse oxidativo e parâmetros hematológicos. Nos dois grupos tratados com o cogumelo ocorreu redução nos níveis maternos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), nos níveis de triglicérides, colesterol e aumento de HDL-col. Além disso, não foi capaz de alterar a redução do ganho de peso materno, mas protegeu os conceitos das perdas pós-implantação, das anormalidades externas e das alterações esqueléticas promovidas pela STZ. Observou-se aumento das medidas fetais no grupo (GDM+Ab_b), o que indica possível efeito protetor do cogumelo quando administrado antes da estreptozotocina. **Conclusão:** A dose intravenosa de 40 mg/kg de STZ promoveu diabetes severo. Os testes pré-clínicos empregados para a avaliação da administração diária de *Agaricus blazei* no GDM-STZ sugerem potencialidade como alimento funcional. A caracterização nutricional do cogumelo indicou importante atividade antioxidante. Além disso, o cogumelo promoveu melhora no desempenho reprodutivo de ratas GMD-STZ e não interferiu com o desenvolvimento intrauterino dos fetos.

Palavras-Chave: *Agaricus blazei*, Alimento Funcional, Diabetes Gestacional, Estreptozotocina, Toxicologia da Reprodução.

ABSTRACT

Introduction: Increased maternal and perinatal mortality rates are associated with increasing numbers of gestational diabetes mellitus (GDM). Diabetic mothers who do not receive treatment during pregnancy are more likely to have children with heart and respiratory problems, jaundice, episodes of postpartum hypoglycemia, and still uterine death. The prevention and treatment of GDM (gestational diabetes mellitus) is of utmost importance, with nutritional therapy being one of the main forms for adequate glycemic control. Interest in the mushroom *Agaricus blazei* has been increasing over the years because of its anti-diabetic effect, which are related to its nutritional value and potential therapeutic actions. The presence of β -glucans and phenolic compounds indicates that this mushroom can be used as nutritional supplement with high antioxidant power. **Purpose:** To evaluate the daily administration of *Agaricus blazei* in gestational diabetes mellitus of rats induced by streptozotocin (GDM-STZ) by means of pre-clinical tests, considering its potential as a functional food. **Methods:** Perinatal assessment techniques were used with daily maternal exposure to *Agaricus blazei* freeze-dried powder (GDM + Ab_b) and after (GDM + Ab_a) the induction of gestational diabetes with streptozotocin (40 mg / kg, intravenous) on day 8 of gestation. The following were performed: (1) characterization of the mushroom (2) daily weight monitoring (3) maternal oral glucose tolerance test; (4) complete maternal hemogram (5) biochemical and maternal blood oxidative stress assessments and biochemical evaluation of amniotic fluid; (6) insulin dosages (7) evaluation of reproductive capacity (8) assessments of embryo-fetal development; (9) histological evaluation of the placenta. **Results:** *Agaricus blazei* did not reduce the severe hyperglycemia of the mother-concept, presenting an increase of platelets in the GDM + Ab_b group. However, it favored a good antioxidant activity, improving some parameters of oxidative stress and hematological parameters. In both groups treated with the mushroom there was a reduction in the levels of ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase). It also reduced levels of triglycerides, cholesterol and increased HDL-col. *Agaricus blazei* was not able to alter the reduction in maternal weight gain, but it protected the animals from external and skeletal abnormalities, post-implantation losses and promoted increased fetal measurements, indicating a possible protective effect of the mushroom when administered before streptozotocin. **Conclusion:** The intravenous dose of 40 mg / kg STZ promoted severe and prolonged diabetes. Preclinical tests used to evaluate the daily administration of *Agaricus blazei* in streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus (GDM-STZ) suggest potentials as a functional food. The nutritional characterization of the mushroom indicated important antioxidant activity. In addition, the mushroom promoted improvement in the reproductive performance of GMD-STZ rats and did not interfere with the intrauterine development of the fetuses.

Key Words: *Agaricus blazei*, Functional Food, Gestational Diabetes, Streptozotocin, Reproductive Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto dos cogumelos comestíveis mais conhecidos no Brasil.	17
Figura 2 - Fluxograma das diferentes etapas do estudo pré-clínico, <i>in vivo</i> com ratas Wistar tratadas com cogumelo <i>Agaricus blazei</i> , antes e depois da indução do GDM-STZ.	21
Figura 3 - Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> <i>in natura</i> (A) e pó liofilizado (B).....	22
Figura 4 - Determinação da atividade antioxidante total (DPPH).....	26
Figura 5 - Fotomicrografia do lavado vaginal de ratas Wistar com a presença de espermatozoide.	27
Figura 6 - Indução do diabetes em ratas Wistar no 8º dia de gestação por meio da aplicação de STZ via caudal.	28
Figura 7 - Definição das doses de STZ para indução do diabetes e administração do cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	29
Figura 8 - Separação dos animais prenhez em quatro diferentes grupos de estudo (Grupo Controle; Controle Diabético; <i>Agaricus blazei</i> antes da STZ; <i>Agaricus blazei</i> depois da STZ).	29
Figura 9 - Administração do pó do cogumelo <i>Agaricus blazei</i> dissolvido em solução salina em ratas GDM/STZ via gavagem.	30
Figura 10 - Teste oral de tolerância à glicose em ratas prenhez.....	31
Figura 11 - Foto da exposição do útero e coleta de sangue das ratas prenhez GDM/STZ.....	32
Figura 12 - Fotos do útero com fetos e com implantações fetais.	35
Figura 13 - Foto de fetos de ratas Wistar GDM/STZ no interior do saco gestacional e coleta de líquido amniótico.	36
Figura 14 - Avaliação morfológica externa de fetos (medidas realizadas com paquímetro). .	37
Figura 15 - Etapas do processo de diafanização e feto corado com Alizarin red S plus e Alcian blue.....	38
Figure 16 - Antioxidant activity of <i>Agaricus blazei</i>	40
Figure 17 - Evolution of weights of pregnancy diabetic rats.....	41
Figure 18 - Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) on 17 th day of gestation.	42
Figure 19 - Hematological parameters.	43
Figure 20 - Activity level of catalase, glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GSH), and TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) on plasma of pregnant rats. ...	44
Figure 21 - Photomicrography of Wistar rat placenta.	48

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Serum biochemical parameters of pregnant rats.	455
Table 2 - Reproductive capacity of female rats.	466
Table 3 - Serum biochemical parameters of amniotic fluid.....	477
Table 4 - Morphological anomalies of fetuses.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab_b – *Agaricus blazei* antes da indução do GDM-STZ

Ab_a – *Agaricus blazei* depois da indução do GDM-STZ

ALT - Alanina aminotranferase

AST - Aspartato aminotranferase

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

GDM - Diabetes mellitus gestacional

GDM-STZ - Diabetes mellitus gestacional induzida por estreptozotocina

DM - Diabetes mellitus

DTNB - 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico

EAG - Equivalente de ácido gálico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROS – Espécie reativa de oxigênio

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GR - Glutathione redutase

GPx - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

Hb - Hemoglobina

HCl - Ácido clorídrico

HDL-col - Lipoproteína de alta densidade

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

HTC – Hematócrito

IAL – Instituto Adolf Lutz

IV - Intravenosa

KCl - Cloreto de potássio

KOH - Hidróxido de potássio

LAPETOX - Laboratório de Pesquisa Toxicológica

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MDA - Malonaldeído

mM - Milimolar

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanômetro

OH - Radical hidroxila

OMS - Organização Mundial da Saúde

O₂ - Oxigênio

PLT - Número de plaquetas

RBC - Contagem total de eritrócitos

rpm - Rotação por minuto

STZ - Estreptozotocina

TAS - Tampão acetato de sódio

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TFK - Tampão fosfato de potássio

TOTG - Teste Oral de Tolerância à Glicose

UNISO - Universidade de Sorocaba

USP - Universidade de São Paulo

WBC - Contagem total de Leucócitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Diabetes mellitus (DM).....	13
1.2 Alimentos funcionais	14
1.3 Cogumelos como alimento funcional	16
1.4 <i>Agaricus blazei</i>.....	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 DELINEAMENTO DO ESTUDO	21
4 MÉTODOS.....	22
4.1 Caracterização do <i>Agaricus blazei</i>	22
4.1.1 Obtenção do pó liofilizado de cogumelo	22
4.1.2 Determinação da composição centesimal.....	23
4.1.3 Dosagens de glucanas e compostos fenólicos.	25
4.1.4 Determinação da atividade antioxidante total	25
4.2 Evolução gestacional e desempenho reprodutivo de ratas GDM-STZ.....	26
4.2.1 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	30
4.2.2 Procedimento de cesárea e coleta de material biológico para análises.....	31
4.2.3 Avaliação materna	32
4.2.3.1 Hemograma	32
4.2.3.2 Análise do estado redox.....	32
4.2.3.3 Análises Bioquímicas dos parâmetros hepáticos, renais, lipídicos e pancreáticos.....	34
4.2.4 Avaliação da capacidade reprodutiva	34
4.3 Desenvolvimento embriofetal	35
4.4 Coleta e processamento de líquido amniótico	35
4.4.1 Avaliação morfométrica da placenta	36
4.4.2 Avaliação morfológica fetal	36
4.4.2.1 Medidas fetais.....	36
4.4.2.2 Análise óssea	37
4.5 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Caracterização nutricional do <i>Agaricus blazei</i>	40
5.2 Evolução gestacional e o desempenho reprodutivo de ratas GDM-STZ.....	41

5.3 Desenvolvimento embrionário fetal	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO EM CEUA-UNISO.	74
ANEXO B - ATESTADO DE SAÚDE ANIMAL.....	75
ANEXO C - RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO INTERNACIONAL.	77
ANEXO D - RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO INTERNACIONAL.	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus (DM)

O diabetes mellitus (DM) inclui um grupo de doença endócrina com características crônico-degenerativas que causam alterações com complicações metabólicas em vários sistemas do organismo. O diabetes mellitus quando desenvolvido no período de gestação (GDM) pode promover o desenvolvimento de nefropatia, retinopatia, neuropatia, eventos cardiovasculares e cerebrovasculares no conceito e, induzir complicações clínicas crônicas, tanto na mãe quanto no filho (GROSS et al., 2005).

Dados da Organização Mundial de Saúde preveem aumento do número de diabéticos de 171 milhões no ano de 2000, para 336 milhões em 2030 (GALINDO et al., 2006).

Por recomendação da *International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups* (2010) o rastreamento das desordens glicêmicas na gestação devem ser realizadas para todas as mulheres, diagnosticadas ou não com diabetes pré-gestacional, no início da gestação. Este rastreamento é preconizado entre a 24^a e 28^a semana e o teste inicial recomendado para a triagem de GDM é a dosagem da glicemia plasmática 1h após teste oral com 50g de dextrose. São aceitos como valores de corte tanto 140 mg/dl quanto 130 mg/dl, com cerca de 80% e 90% de sensibilidade, respectivamente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

A portadora de GDM não tratada tem maior risco de rotura prematura de membranas e de parto pré-maturo, apresentação pélvica fetal e feto macrossômico (YANG et al., 2010). Com relação ao feto, além da macrossomia, o risco para o desenvolvimento de síndrome da angustia respiratória, cardiomiopatia, icterícia, hipoglicemia, hipocalcemia, hipomagnesemia e policitemia com hiperviscosidade sanguínea, encontra-se fortemente aumentado (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

A GDM pode acarretar ao recém-nascido risco de anoxia, prematuridade, infecção, desconforto respiratório, hipoglicemia severa ao nascer, hipocalemia, hiperbilirrubinemia, polidrâmnio, macrossomia, policitemia e óbito (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2008).

O acompanhamento de gestantes com GDM inclui o controle metabólico mediante ajustes na dieta, exercício físico e uso de insulina (WHO, 2013), sendo que a insulina de maneira geral, só é introduzida quando a dieta e o exercício não levam a um controle metabólico (AQUINO et al., 2003). Metzger et al. (2007) e Reader (2007) acreditam que a

terapia nutricional é a primeira opção como tratamento para a grande maioria das gestantes com GDM.

De acordo com Xi et al. (2010), alimentos com alto teor antioxidante são frequentemente recomendados para pacientes diabéticos, especialmente aqueles que contêm compostos fenólicos, pois podem reduzir o estresse oxidativo de macromoléculas essenciais para manutenção da vida (WU; XU, 2015).

1.2 Alimentos funcionais

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80 e se refere aos alimentos naturais, contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo, usados como parte de uma dieta normal e que demonstraram benefícios fisiológicos e/ou, reduziram o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas e nutricionais (STRINGHETA et al., 2007).

No Brasil o “alimento funcional” foi definido por meio da Portaria nº 398, em 30 de abril de 1999, de responsabilidade do Ministério da Saúde, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999), como sendo,

Alimento ou ingrediente que alegar de propriedades funcionais e/ou de saúde, além de funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica, porém no caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde, e da segurança de uso.

Ainda a respeito às definições da RDC nº 398, 1999, em relação às diferenças entre alimentos funcionais e nutracêuticos:

Um alimento funcional deve continuar sendo um alimento e deve demonstrar os seus efeitos em quantidades que possam normalmente ser ingeridas na dieta: não é uma pílula ou uma cápsula, mas parte do padrão alimentar normal. [...] os nutracêuticos são suplementos dietéticos que apresentam uma forma concentrada de um possível agente bioativo de um alimento, presente em uma matriz não alimentícia, e usada para melhorar a saúde, em dosagens que excedem àquelas que poderiam ser obtidas em um alimento normal (exemplo: licopeno em cápsulas ou tabletes) (BRASIL, 1999).

A utilização de determinados alimentos com o intuito de reduzir o risco de doenças é conhecida há milhares de anos, quando o ser humano busca a saúde por meio da alimentação, como citado pelo filósofo grego Hipócrates “que o alimento seja seu medicamento e o medicamento seja o seu alimento” (BASHO; BIN, 2010).

Os avanços na ciência dos alimentos e na nutrição relacionados aos alimentos funcionais demonstram que os alimentos não devem ser apenas para viver, mas também deve ser fonte de bem-estar físico, contribuindo para a prevenção e redução de fatores de risco para várias doenças ou para melhorar certas funções fisiológicas, auxiliando no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, como o Diabetes mellitus, e hipertensão arterial (GAMARANO; FRAIGE FILHO, 2004).

Alimentos funcionais são fontes de importantes substâncias bioativas com capacidade de regularizar funções corporais, de forma a auxiliar na proteção contra doenças. Dentre estas substâncias podem-se citar as vitaminas, as proteínas, as isoflavonas, as fibras alimentares, os peptídeos e os compostos fenólicos (MOLLER et al., 2008).

São considerados alimentos funcionais aqueles que contêm minerais específicos, vitaminas, ácidos graxos (ex. ômega 3 - cujo consumo auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis) ou fibras alimentares (ex. dextrina resistente, frutooligossacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, polidextrose, beta glucana, psillium); alimentos com substâncias biologicamente ativas adicionais, como fitoquímicos ou outros antioxidantes e, probióticos que têm efeitos benéficos sobre o organismo por conter micro-organismos que, supostamente, proporcionam melhor funcionamento do intestino. Os alimentos integrais não modificados, como as frutas e hortaliças, podem ser considerados como a forma mais simples de alimento funcional. Por exemplo, brócolis, cenoura ou tomate são considerados alimentos funcionais porque são ricos em componentes fisiologicamente ativos, como carotenoides (sulforafano, β -caroteno, luteína, zeaxantina e licopeno). Hortaliças verdes e especiarias como mostarda e açafrão, usados extensivamente na culinária indiana, também pertencem a esta categoria. A proteína de soja e a quitosana são componentes considerados na classificação de alimentos funcionais (MAZZA, 1998; WILDMAN, 2006).

Portanto, para um alimento ser considerado alimento funcional e ser utilizado como tal, devem conter algumas das substâncias aprovadas e registradas pela Anvisa (ANVISA, 2008).

1.3 Cogumelos como alimento funcional

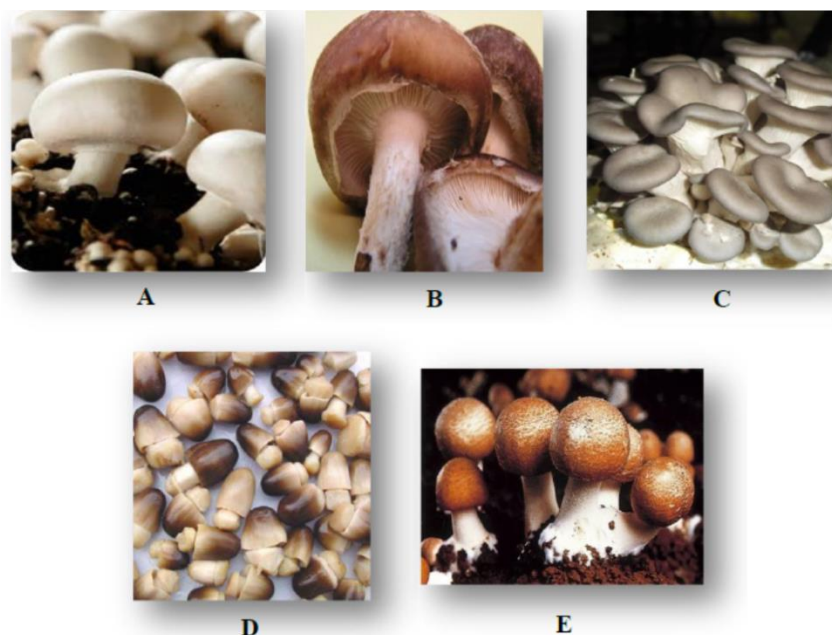
Os cogumelos têm o uso histórico mais longo para as propriedades medicinais, que remontam há pelo menos quatro mil anos. Em países como a Coreia, China e Japão, nos quais os cogumelos são utilizados em grande escala e apresentam significativa importância na economia, os estudos sobre suas propriedades medicinais e nutricionais estão mais sedimentados. Nos últimos anos, são reconhecidas mais de dez mil espécies de cogumelos, porém, somente duas mil espécies pertencentes a 30 gêneros são consideradas comestíveis. Observando a classificação mais recente, apenas quatro classes de fungos são reconhecidas como as *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* e *Chytridiomycota* (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

Os cogumelos, nestes milênios, têm sido utilizados na medicina egípcia, chinesa e japonesa especialmente para o tratamento da maioria das doenças humanas, incluindo hepatite crônica, nefrite, hepatopatia, neurastenia, artrite, bronquite, asma, úlcera gástrica (ZHAO; ZHANG, 1994). Segundo a RDC Nº 272 de 22 de setembro de 2005, cogumelo comestível é definido como:

O produto obtido de espécies de fungos comestíveis, tradicionalmente utilizados como alimento. Pode ser dessecado, inteiro, fragmentado, moído ou em conserva, submetido a processo de secagem, defumação, cocção, salga, fermentação ou outro processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos (BRASIL, 2005).

No Brasil, o consumo de cogumelos se expandiu com o crescimento das colônias orientais (chinesas japonesas e coreanas). O hábito também foi assimilado pelos brasileiros e consiste em um componente muito apreciado pela gastronomia (ANVISA, 2005). Os cogumelos mais conhecidos e consumidos são o cogumelo de Paris (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Shimeji (*Pleurotus ostreatus*), o Hiratake (*Pleurotus sajor-caju*), Cogumelo Palha (*Volvariella volvacea*) e mais recentemente o Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei* Murrill) (EIRA; MINHONI, 1997; GOMES, 2013) (Figura 1).

Figura 1 - Foto dos cogumelos comestíveis mais conhecidos no Brasil.



Nota: **A:** *Agaricus bisporus*, **B:** *Lentinula edodes*, **C:** *Pleurotus ostreatus*, **D:** *Volvariella volvacea*, **E:** *Agaricus blazei* (EMBRAPA, 2009).

Fonte: < <http://www.embrapa.com.br> >.

As principais ações farmacológicas dos cogumelos avaliadas até o presente momento referem-se à proteção de hepatócitos (ITOH et al., 2010; SASIDHARAN et al., 2010; YOSHIOKA et al., 2012); tratamento ou prevenção de doenças crônicas e hipercolesterolemia (CHANDRA et al., 2011; LAWRENCE et al., 2011); efeito de eliminação de radicais pela ingestão de compostos fenólicos como ácido sirínico e ácido vanílico (ISHIKAWA; KASUYA; VANETTI, 2001); efeito imunomodulador pela presença de polissacarídeos e glucanas (ITOH et al., 2009); e efeito antitumoral (TANAKA et al., 2011).

O cogumelo em base seca é um alimento de alto valor nutritivo com quantidades de proteínas quase equivalente às da carne e, acima de alguns vegetais e frutas, rico em vitaminas e de baixo teor de gorduras e carboidratos (MANZI et al., 1999; SAPATA et al., 2005). Além disso, acumula uma variedade de metabólitos secundários, tais quais compostos fenólicos, polipeptídios, terpenos e esteroides possivelmente envolvidos em seus efeitos medicinais (TURKOGLU et al., 2007).

1.4 *Agaricus blazei*

O cogumelo *Agaricus blazei*, conhecido popularmente como cogumelo do sol, é nativo do Brasil, taxonomicamente esse cogumelo pertence ao reino Fungi, divisão *Basidiomycetes*,

ordem *Agaricales*, família *Agaricaceae*, gênero *Agaricus* (WASSER et al., 2002; DIAS et al., 2004).

A descoberta do *Agaricus blazei* ocorreu no município de Piedade, região sudoeste de São Paulo há mais de 40 anos pelo imigrante japonês Takatoshi Furumoto, porém só foi identificado em 1993, por Paul Heinemann (Bélgica). Entretanto, tal espécie já havia sido descrita na Flórida em 1995 por Murril, que a considerou de espécie natural da América do Norte (AMAZONAS, 2004). Essa denominação tem sido a mais usada na literatura para se referir aos aspectos biotecnológicos e medicinais do cogumelo, assim como para a maioria de seus produtos comercializados.

O interesse dos pesquisadores no cogumelo *Agaricus blazei* relaciona-se às suas possíveis propriedades farmacológicas sobre o sistema imunológico, agindo como ativador das células B do sistema imune demonstrando atividade anticarcinogênica, além de ser utilizado para a proteção contra uma variedade de patologias como câncer, diabetes mellitus, hiperlipidemia, aterosclerose, hepatite crônica e infecções por vírus e bactérias (BERNARDSHAW et al., 2006; FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO et al., 2007; SORIMACH et al., 2001). Com relação a essa possível ação farmacológica sobre o sistema imune, as β -glucanas e os compostos fenólicos, em especial, têm despertado grande interesse na pesquisa científica.

No tocante às β -glucanas, por se tratar de fibras solúveis (viscosas ou facilmente fermentáveis no cólon), evidências científicas têm demonstrado que apresentam significativa importância na redução do colesterol sanguíneo e na absorção de glicose (KIM et al., 2005). Os compostos presentes no *Agaricus blazei* parecem agir reparando as lesões das células β -pancreáticas, induzidas pela exposição à estreptozotocina (STZ) (MA et al., 2015; YANG et al., 2010; NIWA et al., 2011; RAHAR et al., 2011; KIM et al., 2005).

Os compostos fenólicos são metabólicos secundários dos cogumelos, compostos fitoquímicos que estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, apresentando atividade antioxidante. Antioxidantes são moléculas capazes de doar um elétron para as espécies reativas de oxigênio (EROS), neutralizando, diminuindo ou eliminando sua capacidade de danificar as células e as principais biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (LOBO et al., 2010; SOARES, 2002). São encontrados amplamente no reino vegetal principalmente em ervas, especiarias e frutas, sendo essenciais no crescimento das plantas e eficientes na prevenção da auto-oxidação. Os macrofungos também são fontes desta molécula sendo um dos principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante dos cogumelos (JAYAKUMAR et al., 2011; WANG et al., 2014).

Os compostos fenólicos encontram-se entre as principais e mais potentes substâncias bioativas, proporcionando benefícios à saúde, associados à redução do risco de doenças crônicas e degenerativas, como o diabetes (BARROS et al., 2009; JAYAKUMAR et al., 2011). Os principais encontrados em cogumelos comestíveis e quantificados por técnicas cromatográficas são os ácidos gálico, protocatecuico, homogentísico, vanílico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, gentísico, cinâmico, cafeico, ferúlico, clorogênico e pirogálico (PALACIOS et al., 2011; VAZ et al., 2011; CARNEIRO, 2013; DOĞAN, 2013; REIS et al., 2013).

No diabetes, o aumento da produção de EROS tem sido atribuído à auto-oxidação da glicose devido ao quadro de hiperglicemia. A glicose oxidada pode induzir a peroxidação de lipídeos e a oxidação de proteínas (PÉREZ-MATUTE; ZULET; MARTÍNEZ, 2009). Estudos demonstraram que no diabetes ocorre à diminuição no mecanismo de defesa, com alteração das enzimas antioxidantes (AKSOY et al., 2005, NYAM et al., 2017). Assim, os estudos com compostos fenólicos estão se tornando cada vez mais importantes, pois as defesas antioxidantes endógenas podem não estar sendo suficientes para manter níveis normais de EROs no diabetes (BALASUBASHINI et al., 2004, ZHANG et al., 2018).

Por outro lado, o uso de *Agaricus blazei* durante o período de gestação deve ser bem orientado, tendo em vista que os constituintes destes fungos, quando administrados em quantidades excessivas, podem atravessar a placenta e gerar danos ao concepto (GERENUTTI et al., 2014). Os efeitos potencialmente tóxicos da ingestão excessiva de alimenos contendo antioxidantes ainda não foram esclarecidos, pois se sabe que em doses elevadas se tornam pró-oxidantes que geram radicais livres que inibem enzimas-chaves envolvidas no metabolismo hormonal. Assim, em altas doses, os efeitos adversos podem superar seus efeitos benéficos (CHRISTINE; SKIBOL- MARTYN; SMITH, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de testes pré-clínicos, os efeitos da administração diária de *Agaricus blazei* no diabetes mellitus gestacional de ratas induzido por estreptozotocina (GDM-STZ), considerando-se suas potencialidades como alimento funcional.

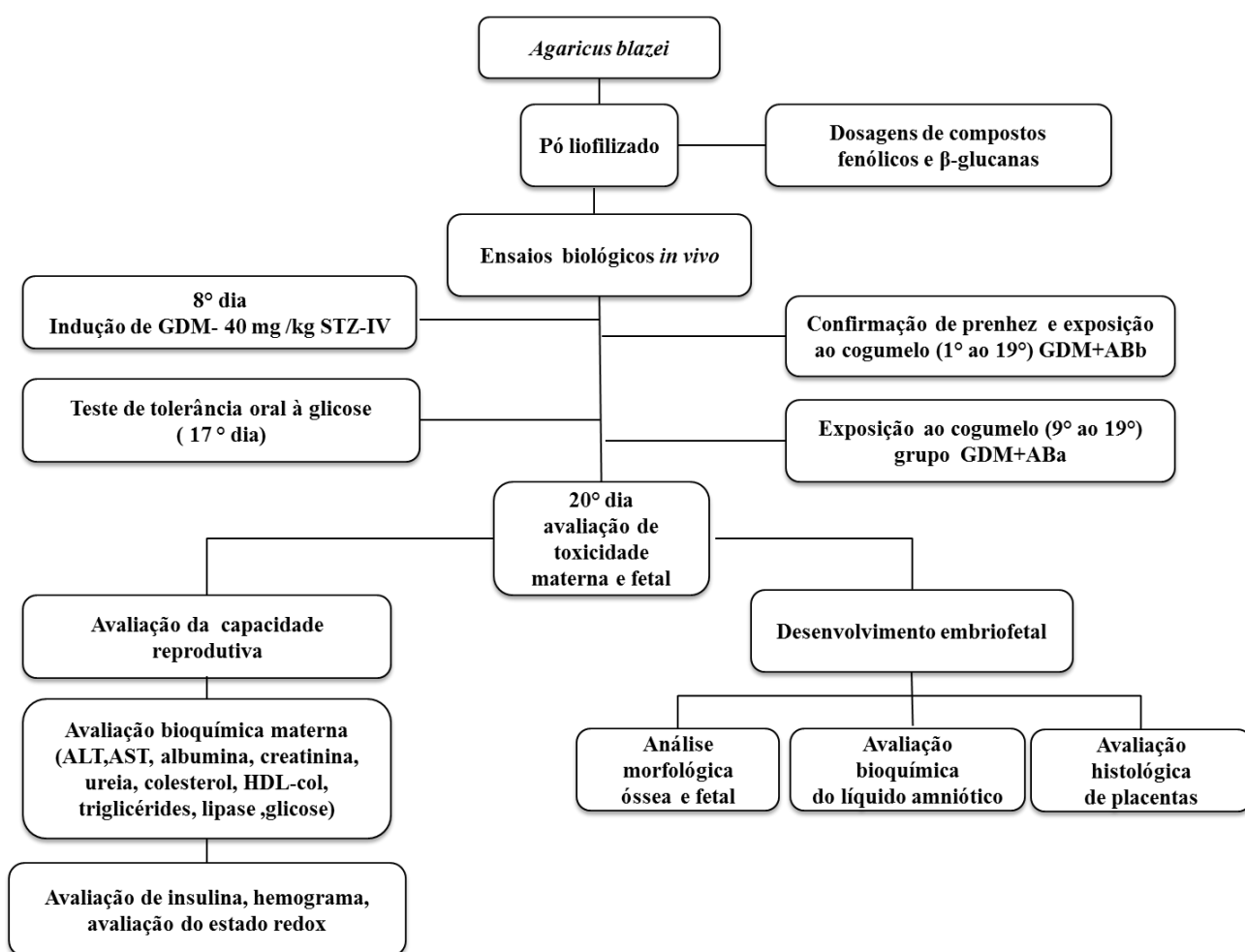
2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar nutricionalmente o cogumelo *Agaricus blazei* por meio da análise de composição centesimal, dosagens de compostos fenólicos e β -glucanas e da atividade antioxidante.
- Avaliar a evolução gestacional e o desempenho reprodutivo de ratas GDM-STZ.
- Avaliar os efeitos do *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento intrauterino de ratas expostas à estreptozotocina.

3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio pré-clínico *in vivo* (Figura 2). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba CEUA/UNISO Protocolo nº 089/2016 (ANEXO A) e recebeu apoio FAPESP (Processo nº 2015/24566-9).

Figura 2 - Fluxograma das diferentes etapas do estudo pré-clínico, *in vivo* com ratas Wistar tratadas com cogumelo *Agaricus blazei*, antes e depois da indução do GDM-STZ.



Fonte: Elaboração Própria.

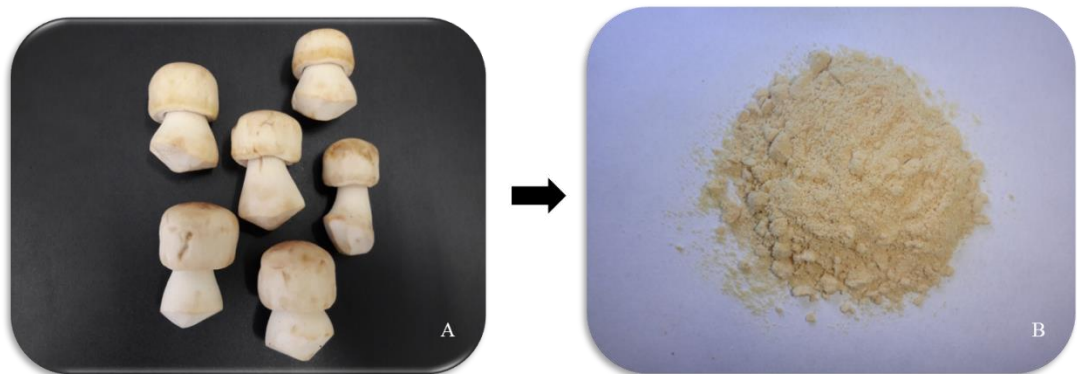
4 MÉTODOS

4.1 Caracterização do *Agaricus blazei*

4.1.1 Obtenção do pó liofilizado de cogumelo

Os cogumelos foram adquiridos comercialmente; amostras de cogumelo *in natura* foram picadas, em tamanhos homogêneos, no mesmo dia da coleta e foram armazenadas em *biofreezer* a -80°C (REVCO® ULT-1386-3-D) por período de aproximadamente 24 h; o material congelado foi liofilizado em Liofilizador - Termo Savant, LK-40, por aproximadamente 48 horas, até a obtenção de 10% de massa seca. A amostra seca foi moída (moinho de facas e martelo marca Marconi®), em seguida tamisada em tamises (malha 50 e malha 60), com a finalidade de obtenção de partículas homogêneas (Figura 3). O pó tamisado foi acondicionado em embalagens plásticas herméticas mantidas em dessecador. No momento da administração o pó de cogumelo foi suspenso em solução salina 0.9%.

Figura 3 - Cogumelo *Agaricus blazei in natura* (A) e pó liofilizado (B).



Nota: A: *Agaricus blazei in natura*. B: Pó do cogumelo seco e liofilizado.

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2 Determinação da composição centesimal

Para verificar a composição centesimal do *Agaricus blazei*, foram realizadas análises em triplicata do pó liofilizado, no laboratório de Alimentos da Universidade de Sorocaba – Uniso. A determinação da umidade, cinzas, lipídeos e proteínas foram feitas segundo métodos adaptados daqueles descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O conteúdo de carboidratos foi calculado por diferença.

Umidade - para a determinação de umidade foram pesadas cerca de 2 g de amostras liofilizadas em cápsula de porcelana previamente dessecados e tarados em balança analítica (SHIMADZU® - ATX 224), e submetidas a 105°C, durante 24 horas em estufa (FANEM®). Ao atingir peso constante, as amostras foram colocadas em dessecador para resfriar até a temperatura ambiente. Os valores da umidade foram expressos de acordo com a equação:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde,

N = nº de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = nº de gramas da amostra

Cinzas - para a análise do resíduo mineral fixo (cinzas), pesou-se cerca de 2 g das amostras liofilizadas, e estas foram incineradas com auxílio do bico de Bunsen. Em seguida, foram levadas para a mufla a 550°C (QUIMIS®), até eliminação completa da matéria orgânica, que ocorreu no período seis horas. Após este tempo retirou-se as amostras da mufla para serem resfriadas em dessecador. Os valores obtidos das cinzas foram expressos de acordo com a equação:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde,

N = nº de gramas de cinzas

P = nº de gramas da amostra

Lipídios - a determinação dos lipídios foi realizada no aparelho de extração de gordura automático (Extrator de Soxhlet, TECNAL® - TE 044-5/50), utilizando éter etílico como solvente orgânico. Pesou-se cerca de 1 g das amostras liofilizadas em cartuchos de papel de

filtro, que foram colocados em seus respectivos copos reboiler (previamente dessecados) que foram adaptados ao condensador do aparelho de extração de gordura, mantendo as amostras imersas diretamente em 100 ml de éter em ebulição sob aquecimento em chapa elétrica a 80°C, durante seis horas. Ao término desse tempo, o solvente foi recuperado. Retiraram-se os cartuchos com os papéis de filtro, transferindo os copos do extrator para estufa (FANEM®) a 105°C por cerca de uma hora a fim de eliminar o solvente residual. Após este procedimento, os copos foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente, e realizada as pesagens. Os valores foram encontrados de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde,

N = nº de gramas de lipídio

P = nº de gramas da amostra

Proteínas - O procedimento utilizado para a determinação da quantidade de proteína presente no cogumelo analisado foi realizado conforme as etapas a seguir: digestão, destilação e titulação (IAL, 2008). No processo de digestão, pesou-se aproximadamente 70 mg das amostras liofilizadas em papel vegetal, e estas foram inseridas em tubos de Kjeldahl, adicionando cerca de 2 g de mistura catalítica e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram aquecidas em bloco digestor (TECNAL® - TE 007-MP), mantendo a princípio a temperatura de 50°C por 1h. Posteriormente, a temperatura foi sendo elevada gradativamente até atingir de 350 a 400°C. Quando o líquido da amostra ficou límpido e transparente, de tonalidade azul esverdeada, retirou-se a amostra do aquecimento.

Na etapa de destilação, acoplou-se ao destilador de nitrogênio erlenmeyer contendo 5 mL de solução de ácido bórico e 3 gotas do indicador vermelho de metila. Em seguida, tubo de Kjeldahl foi adaptado ao destilador de nitrogênio (TECNAL® - TE 036/1), e adicionados 25 mL de solução de hidróxido de sódio a 50% a fim de volatilizar a amônia, que foi destilada e recebida na solução de ácido bórico até o volume de 50 ml. Por conseguinte, ocorreu a titulação com solução padrão de ácido clorídrico 0,2 mol/L até a viragem do indicador. Os resultados obtidos para proteínas foram expresso conforme equação:

$$\% \text{ Proteína Total} = \frac{(VA-VB) \times N \times F \times 14,007 \times 6,25 \times 100}{P \text{ (mg)}}$$

Onde,

P = massa da amostra em mg

VA = volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL)

VB = volume de HCl gasto na titulação do branco (mL)

N = normalidade

F = fator de correção do HCl

4.1.3 Dosagens de glucanas e compostos fenólicos.

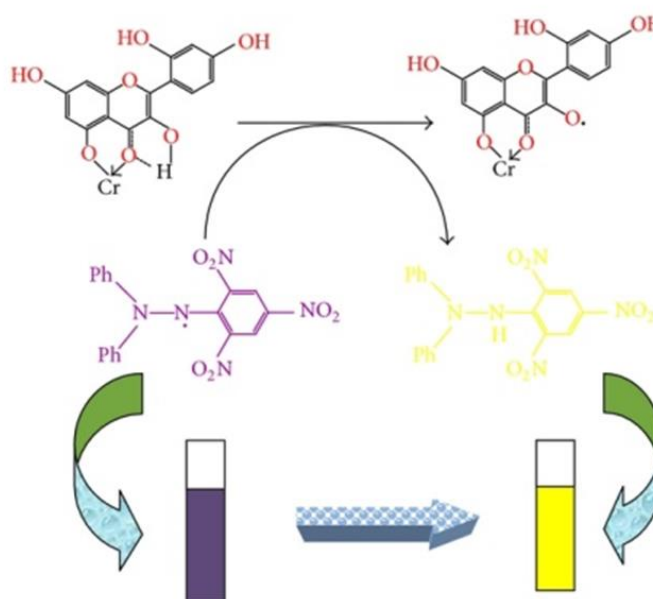
A determinação de glucanas foi realizada em triplicata, por hidrólises enzimáticas e químicas, realizadas por kit comercial *Mushroom and yeast beta-glucan - Megazyme®*.

A determinação de compostos fenólicos por análise colorimétrica segundo o método adaptado de Folin-Ciocalteu (SCALBERT; MONTIES; JANIN, 1989), foi realizada em triplicata com as modificações realizadas por Ramirez-Anguiano et al. (2007). A leitura da absorbância (760 nm) da solução foi realizada em espectrofotômetro (MultiSpec-1501, SHIMADZU®). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG/g) de amostra em base seca.

4.1.4 Determinação da atividade antioxidante total

O método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) baseia-se na transferência de elétrons. Por ação de um antioxidante (no caso, os compostos fenólicos) o DPPH, que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. Tal mudança de cor é o resultado da interação entre o radical livre DPPH e as possíveis substâncias doadoras de elétrons, provocando também o decréscimo da absorbância das soluções (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). (Figura 4)

Figura 4 - Determinação da atividade antioxidante total (DPPH).



Fonte: Panhwar; Memon, 2014.

Assim, o pó do cogumelo *Agaricus blazei* foi dissolvido em solução salina, na mesma concentração dada às ratas prenhes. O *Agaricus blazei* solubilizado foi misturado à solução etanólica de DPPH, homogeneizado e as leituras, em espectrofotômetro UV-VIS a 515 nm, foram realizadas no tempo inicial zero, e ao final de 15, 30, 45 e 60 minutos. Como branco, utilizou-se etanol, e como controle foi utilizado solução de DPPH e etanol. A capacidade de sequestrar o radical, expressa como percentual de inibição, foi calculada de acordo com a seguinte equação matemática:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs 1} - \text{Abs 2} \times 100}{\text{Abs 1}}$$

Onde,

Abs 1 = Absorbância do controle

Abs 2 = Absorbância da amostra testada

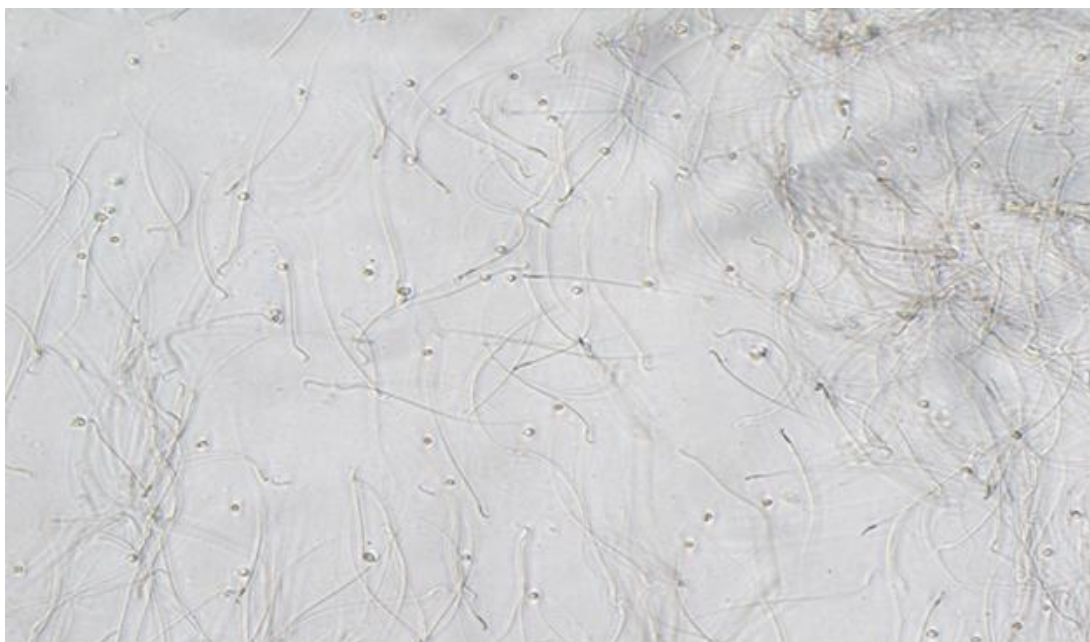
4.2 Evolução gestacional e desempenho reprodutivo de ratas GDM-STZ

Foram utilizados Ratos Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 180 a 200 g, adquiridos com respectivos atestados de sanidade (ANEXO B) do Biotério de Produção de Ratos da Universidade de São Paulo - USP. Os animais foram ambientados no Biotério de

Experimentação Animal do LAPETOX, conforme as normas de bem-estar animal, em gaiolas ventiladas, aclimatadas e com forração de maravalha; em temperatura e ciclos claro/escuro, controlados automaticamente, a $23\pm3^{\circ}\text{C}$ e 12h, respectivamente. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Para o acasalamento, os animais foram alojados em número de três, um macho com duas fêmeas, por um período noturno de 12 horas.

Por meio de observações microscópicas (Microscópio Biológico, Modelo Axio Lab.A1, ZEISS®) (Figura 5), a indicativa do primeiro dia da prenhez foi a presença de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal (GERENUTTI; DEL FIOLE; GROppo, 2006).

Figura 5 – Fotomicrografia do lavado vaginal de ratas Wistar com a presença de espermatozoide.



Fonte: Elaboração própria.

As ratas foram alojadas em condições especiais, considerando-se o bem-estar animal, com um animal por gaiola e, divididas em quatro grupos de seis animais cada.

Para a indução do diabetes mellitus severo, após permanecerem em jejum de 6 horas, os animais receberam, por via intravenosa caudal, 40 mg/kg de estreptozotocina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) diluída em 0,1 mol/L de tampão citrato, pH 4,5 (TOMA et al., 2015; VOLPATO et al., 2008), conforme ilustra a Figura 6.

A administração do diabetes foi feita via intravenosa caudal por ser mais apropriada para obtenção da dose diabetogênica esperada e devido à permanência do diabetes e à menor probabilidade de falha na indução (DA DELFINO et al., 2002).

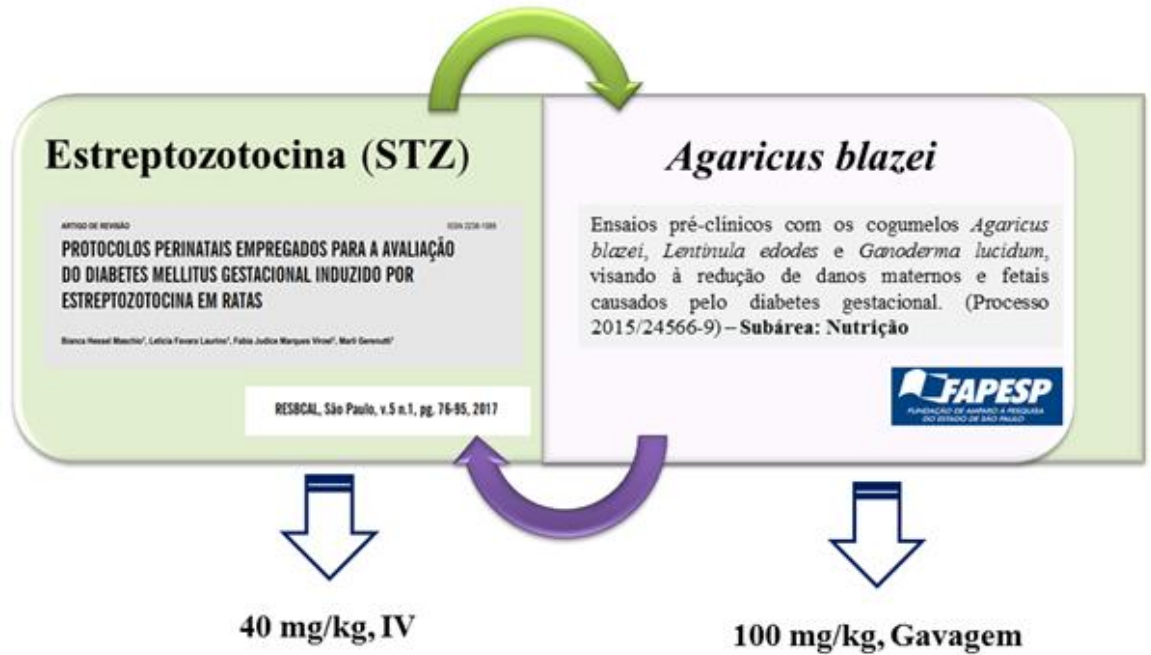
Figura 6 - Indução do diabetes em ratas Wistar no 8º dia de gestação por meio da aplicação de STZ via caudal.



Fonte: Elaboração própria.

O estudo foi dividido em duas formas de exposição ao cogumelo: (I) antes da indução do GDM pela STZ para observar a possível proteção materna dos danos induzidos pela STZ; (II) após a indução do GDM pela STZ para se observar um possível tratamento dos danos maternos e fetais induzidos pela STZ. A escolha da dose de STZ para indução do diabetes e administração do *Agaricus blazei* estão descritos na Figura 7.

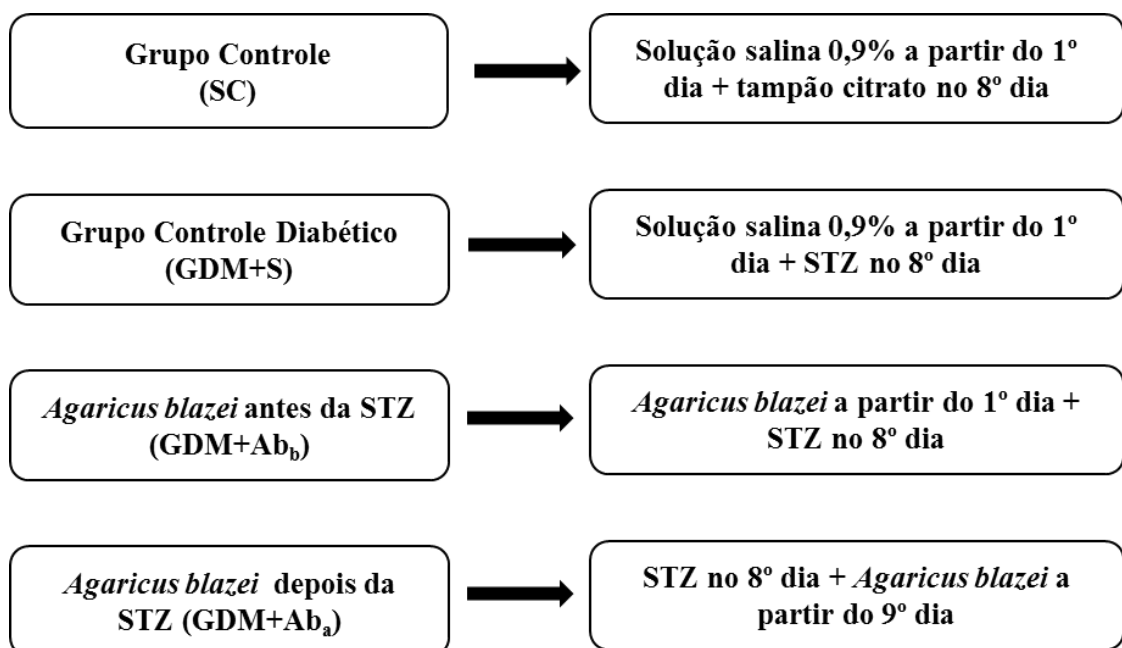
Figura 7 - Definição das doses de STZ para indução do diabetes e administração do cogumelo *Agaricus blazei*.



Fonte: Elaboração Própria.

As ratas prenhes foram distribuídas de forma randomizada entre os grupos, como descrita na (Figura 8).

Figura 8 - Separação dos animais prenhes em quatro diferentes grupos de estudo (Grupo Controle; Controle Diabético; *Agaricus blazei* antes da STZ; *Agaricus blazei* depois da STZ).



Fonte: Elaboração própria.

Na exposição (I) o *Agaricus blazei* foi administrado por via oral (gavagem), conforme ilustra a Figura 9, do 1º ao 19º dia de prenhez e a STZ foi administrada no 8º dia de prenhez. Na exposição (II) a STZ foi administrada no 8º dia de prenhez e o cogumelo foi administrado a partir do 9º até o 19º dia.

Figura 9 - Administração do pó do cogumelo *Agaricus blazei* dissolvido em solução salina em ratas GDM/STZ via gavagem.



Fonte: Elaboração própria.

Em todos os grupos estudados, após 48 horas da administração da STZ ou do tampão citrato, os animais permaneceram em jejum por 6 horas e, o sangue periférico do pavilhão auricular foi colhido para dosagem de glicose (Monitor de Glicemia FreeStyle Lite, Abbott). Não houve óbito e todos os animais que apresentaram glicemia acima de 120 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos nos grupos.

A dose 100 mg/Kg/dia de *Agaricus blazei* foi definida com base em estudos prévios (GERENUTTI et al., 2014). O peso dos animais foi acompanhado diariamente.

4.2.1 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Para o acompanhamento da GDM-STZ foi empregado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que foi realizado no dia 17º de prenhez. Após jejum de 6 horas, uma solução

de dextrose foi administrada por gavagem (2 g/kg de peso corporal); e as amostras de sangue colhidas do pavilhão auricular foram utilizadas para determinações de glicemia, em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos (DE MELLO et al., 2001), utilizando Monitor de Glicemia FreeStyle Lite, Abbott (Figura 10).

Figura 10 - Teste oral de tolerância à glicose em ratas prenhez.

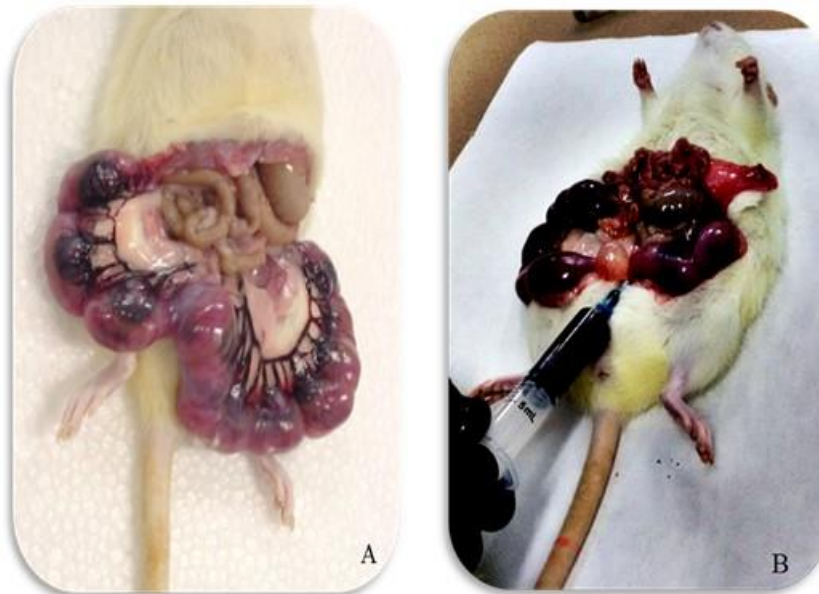


Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Procedimento de cesárea e coleta de material biológico para análises

No vigésimo dia de prenhez, as ratas em jejum e foram anestesiadas com quetamina (anestésico geral na dose de 100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (relaxante muscular na dose de 6 mg/Kg), via intraperitoneal. Foram realizadas as cesáreas, com uma incisão longitudinal na linha alba para exposição do útero e dos ovários. O sangue foi coletado por punção venosa hepática (Figura 11) em seringa previamente heparinizada, e transferido para dois tubos: contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para avaliação dos parâmetros hematológicos e de estado redox e, outro sem o anticoagulante e com gel separador para análises bioquímicas.

Figura 11 - Foto da exposição do útero e coleta de sangue das ratas prenhez GDM/STZ.



Nota: A: Exposição do útero. B: Coleta do sangue materno por punção venosa hepática.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.3 Avaliação materna

4.2.3.1 Hemograma

Os seguintes parâmetros hematológicos maternos foram analisados com o auxílio do equipamento automático Hematologia XS 1000i WAS, Roche®: hemoglobina, hematócrito, contagem total de leucócitos (WBC), contagem total de eritrócitos (RBC) e número de plaquetas (PLT).

4.2.3.2 Análise do estado redox

Para o estado redox foram analisadas as atividades/concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por espectrofotometria (PerkinElmer®, Lambda 35).

A determinação da concentração de GSH se deu pela quantificação dos tióis totais, que foi realizada por espectrometria UV-VIS, baseada no método de Ellman (1959). Para isso, 150 µl de sangue total sempre mantido em banho de gelo, foi hemolisado com 100 µl de Triton X-100 a 10% e precipitado com 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 30%. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm e 4°C por 10 minutos em centrífuga refrigerada e os

sobrenadantes separados. Após, 50 µl de sobrenadante e 50 µl de 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) 10 mM foram diluídos em 900 µl de tampão fosfato (pH 7,4), formando um complexo amarelo. Uma curva de calibração com concentrações pré-definidas de GSH (0,005; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1 mM) foi utilizada para o cálculo da concentração. Os resultados foram expressos em µM de sangue total.

A atividade da enzima antioxidante GPx foi determinada em sangue, baseada na oxidação do NADPH a 25°C. O sangue foi diluído 40 vezes em tampão fosfato de potássio com EDTA, pH 7,0. Em seguida, 20 µL da amostra diluída foi acrescentado em 880 µL de solução contendo glutatona reduzida, glutatona redutase, NADPH, azida sódica e 100 µL de H₂O₂. A atividade da GPx foi monitorada por dois minutos, a 340 nm, de acordo com a metodologia de Paglia e Valentine (1967). Pela medida do decaimento da absorbância do NADPH foi possível determinar a atividade da GPx, uma vez que ela é proporcional ao consumo de NADPH. Os dados foram expressos em µmol NADPH/min/g Hb, usando valores de Hb (hemoglobina) expressos em g/L.

A atividade da enzima catalase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS utilizando método de Aebi (1984). O método baseia-se na decomposição do H₂O₂ pela catalase, ao longo do tempo, monitorado a 240 nm. Para tanto, o sangue foi diluído 60 vezes em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. Uma alíquota de 20 µL de sangue diluído foi misturada a 1910 µL de mesmo tampão fosfato de potássio, e 70 µL de H₂O₂ foram adicionados, dando início à reação. As mudanças nas absorbâncias foram monitoradas por três minutos. Uma constante de variação (κ), relacionada com a Hb, auxilia na expressão dos valores da atividade no sangue (κ /gHb).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são importantes para avaliar a peroxidação lipídica, incluindo o malonaldeído (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Alíquotas de plasma (150 µL) foram misturados com 50 µL de NaOH e 100 µL de Milli-Q Water™ (Millipore, Billerica, MA, EUA). A mistura foi incubada durante 30 min a 60 °C com agitação. Então, 500 µL de H₃PO₄ 6%, 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% e 100 µL de dodecilsulfato de sódio a 10% foram adicionados às amostras, que ficaram em banho-maria durante 45 minutos a 90 °C. Os produtos da peroxidação lipídica reagiram com TBA em condições ácidas para formar uma substância rosa, cuja absorbância foi lida em espectrofotômetro a 532 nm. Foi utilizada curva de calibração (predefinida concentrações de 0,57, 1,43, 2,86 e 5,71 µM) para calcular a concentração de MDA no material.

4.2.3.3 Análises Bioquímicas dos parâmetros hepáticos, renais, lipídicos e pancreáticos

Os seguintes parâmetros bioquímicos foram analisados com o auxílio do equipamento automático Cobas C111, Roche®: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, creatinina, ureia, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-col), triglicérides, glicose e lipase. A partir dos resultados de medição fotométrica que determinam a quantidade de absorbância do fluído, os parâmetros foram calculados pelo equipamento.

Na avaliação hepática, as determinações das atividades das aminotransferases (ALT e AST) foram realizadas por métodos enzimáticos, cinéticos e ultravioleta. O índice de Ritis foi calculado por meio da relação entre os níveis de AST por ALT (RIEF et al., 2016) para avaliação da extensão da lesão hepática.

A concentração sanguínea de albumina foi determinada por método colorimétrico, não enzimático e de ponto final.

A avaliação clínica laboratorial do perfil renal foi determinada pela concentração sanguínea de creatinina e ureia, realizadas por métodos cinéticos e colorimétricos, sendo o primeiro não enzimático e o segundo, enzimático.

As medidas de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides foram feitas por métodos enzimáticos colorimétricos de ponto final, sendo o HDL-col obtido pela separação da fração HDL das demais lipoproteínas por meio da formação de complexos hidrossolúveis com íons de magnésio e sulfato de dextrano.

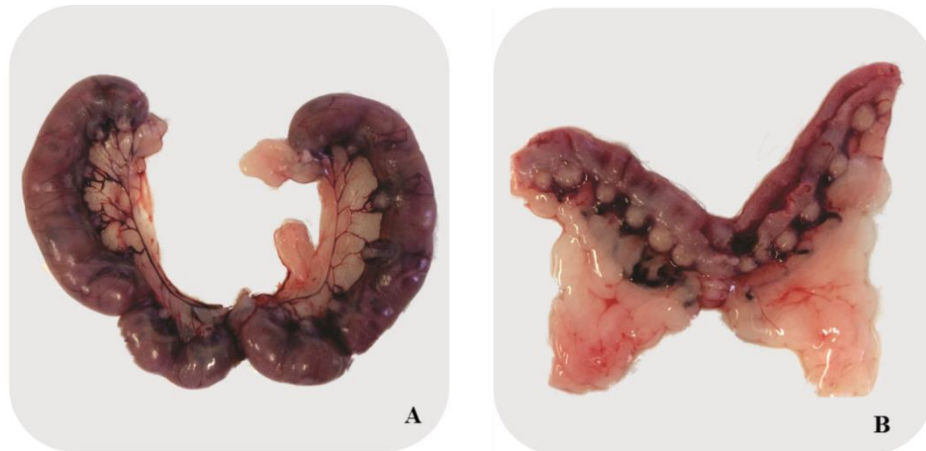
A glicose foi obtida pela utilização de métodos enzimáticos, colorimétricos e de ponto final.

A dosagem plasmática de insulina foi realizada por teste Elisa, de fase sólida, baseado no princípio Sanduíche, utilizando-se kit comercial específico para ratos, Rat/Mouse Insulin Elisa Kit - Merck®.

4.2.4 Avaliação da capacidade reprodutiva

Para avaliação da capacidade reprodutiva, os cornos uterinos foram seccionados para a retirada dos sacos gestacionais e os ovários foram retirados. Em seguida, o útero foi inspecionado quanto ao número de fetos, a vitalidade fetal, número de implantações e de reabsorções visíveis. (Figura 12). Após a realização do procedimento as ratas foram sacrificadas por aprofundamento anestésico, seguido de ruptura diafragmática.

Figura 12 - Fotos do útero com fetos e com implantações fetais.



Nota: A: Útero com fetos. B: Útero quanto ao número de implantações.

Fonte: Elaboração própria.

Para avaliar as perdas pós-implantação foi utilizada a equação abaixo (GERENUTTI et al., 2014).

Equação 1:

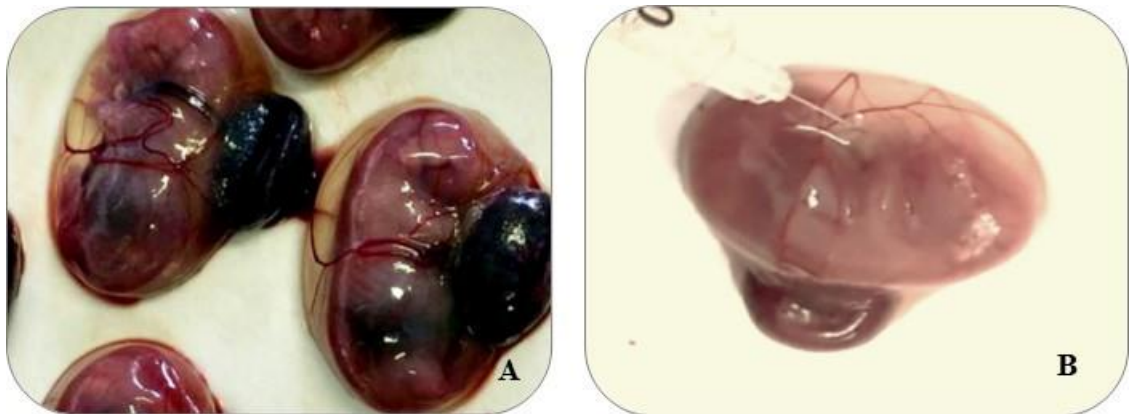
$$\% \text{ Perdas Pós implantação} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de implantações} - \text{n}^{\circ} \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^{\circ} \text{ de implantações}} \times 100$$

4.3 Desenvolvimento embriofetal

4.4 Coleta e processamento de líquido amniótico

O líquido amniótico foi coletado dos sacos gestacionais (Figura 13) e transferido para dois tubos tipo eppendorf. O processamento das amostras foi feito mediante uma adaptação do método utilizado por Zogno, Miglino e Oliveira (2004). No momento da análise, a amostra de líquido amniótico foi descongelada e centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm e 22°C, o sobrenadante foi utilizado para realização das análises de ALT, AST, ureia e glicose (equipamento Cobas C111, Roche®). A dosagem de insulina foi realizada por teste Elisa, de fase sólida, baseado no princípio Sanduíche com kit comercial específico para ratos, Rat/Mouse Insulin Elisa Kit - Merck®.

Figura 13 - Foto de fetos de ratas Wistar GDM/STZ no interior do saco gestacional e coleta de líquido amniótico.



Nota: A: Fetos no interior do saco gestacional. B: Coleta de líquido amniótico do interior do saco gestacional.

Fonte: Elaboração própria.

4.4.1 Avaliação morfométrica da placenta

Após a abertura do saco embrionário as placentas foram retiradas, pesadas em balança (Ohaus®-AS200S) e utilizadas para avaliação morfométrica.

A análise histológica das placentas foi realizada após as mesmas terem sido fixadas e processadas. A fixação foi feita em formalina tamponada por 48 horas e, a seguir, as amostras foram lavadas em água corrente *overnight*. As placentas foram então armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, foram processadas no Processador Automático de Tecidos PT12 (O Patologista®). A seguir as peças foram emblocadas com parafina histológica.

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo rotativo-manual (O Patologista® MR 2014) com quatro micrômetros de espessura, corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina, e montadas com resina histológica (TOLOSA et al., 2003).

A análise foi feita de forma quantitativa e consistiram das medidas em micrometros da largura e da espessura da placenta, foi realizada com auxílio de microscópio acoplado a câmera digital (Microscópio Biológico, Modelo Axio Lab.A1, ZEISS®).

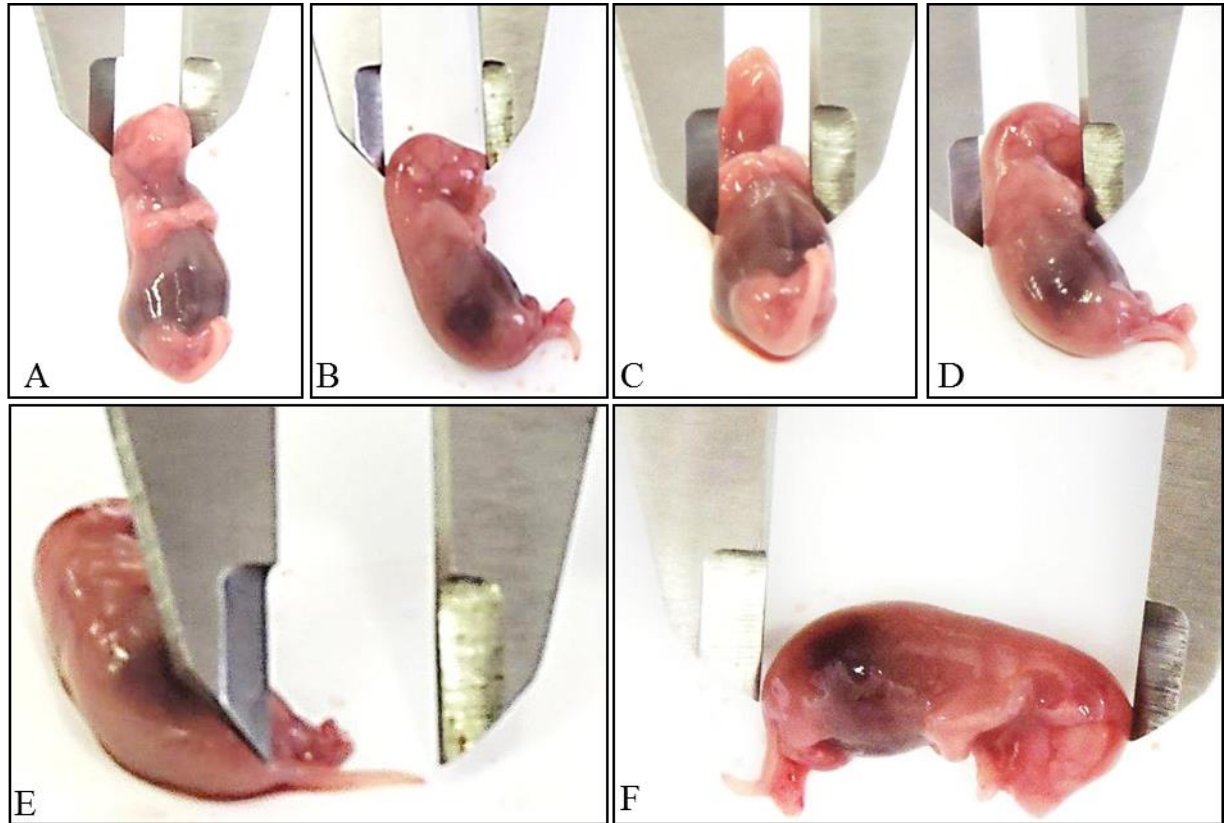
4.4.2 Avaliação morfológica fetal

4.4.2.1 Medidas fetais

Após a ruptura do saco embrionário os fetos foram separados das placentas, pesados em balança (Ohaus®-AS200S), e analisados por meio de medidas morfométricas externas:

ântero-posterior do crânio, látero-lateral do crânio, ântero-posterior do tórax, látero-lateral do tórax, crânio-caudal e cauda (Figura 14); anestesiados e sacrificados com halotano (saturação de cuba).

Figura 14 - Avaliação morfológica externa de fetos (medidas realizadas com paquímetro).



Nota: Medidas - A: Látero-lateral de crânio. B: Ântero-posterior de crânio. C: Látero-lateral de tórax. D: Ântero-posterior de tórax. E: Crânio-caudal. F: Cauda.

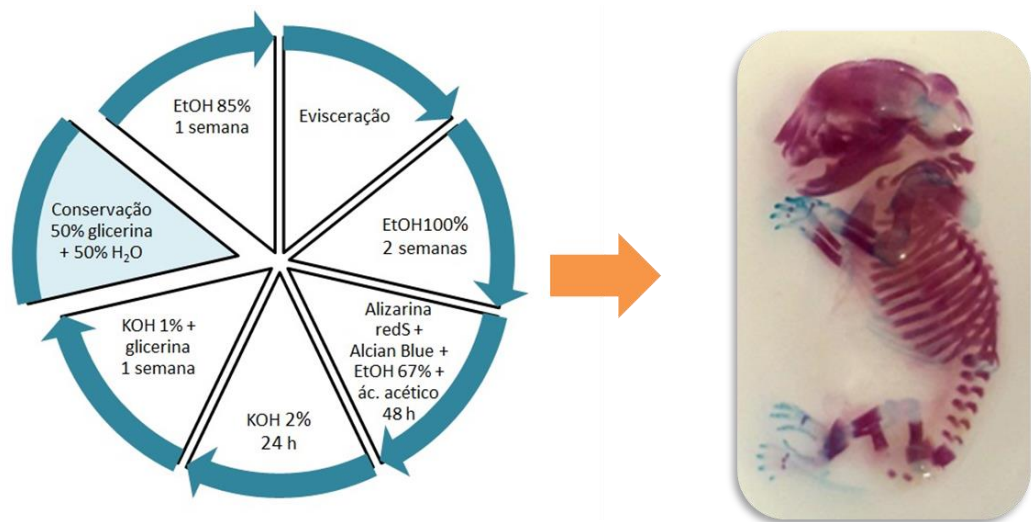
Fonte: Elaboração própria.

4.4.2.2 Análise óssea

Para o estudo ósseo foram realizados os procedimentos de evisceração, diafanização e coloração, segundo Frizo et al. (2014). Os fetos destinados à análise esquelética permaneceram em vidro com tampa de rosca, por período máximo de duas semanas, em álcool a 70%. Em cada um deles foi realizado, um corte transversal abaixo das costelas e cortes oblíquos dos lados direito e esquerdo até a região anal, formando um triângulo. Utilizando uma pinça de ponta fina, foram retirados: o intestino, as vísceras abdominais, o diafragma e as vísceras torácicas. Posteriormente a evisceração, os fetos foram submetidos ao processo de diafanização e coloração com Alizarin red S plus e Alcian blue. A solução de hidróxido de potássio foi utilizada para diafanização da pele e parte da musculatura. A

diafanização foi alcançada com a maceração dos tecidos moles pelo hidróxido de potássio (KOH) e o clareamento com a mistura de solução clareadora (constituída por uma parte de álcool benzílico, duas partes de glicerina e duas partes de etanol absoluto). A Alizarin red S plus e Alcian blue foi empregada para visualizar o esqueleto, uma vez que, se fixa nos locais em que houve ossificação e cora os ossos de vermelho e a cartilagem em azul. A Figura 15 ilustra feto a ser avaliado quanto às alterações ósseas. A avaliação foi realizada por observação direta com auxílio de lupa de bancada. Foram contados os números de calcificações do osso esterno, presença ou ausência de costelas, vertebrae e ossos, calcificação dos ossos do crânio bem como presença dos ossos da pelve.

Figura 15 - Etapas do processo de diafanização e feto corado com Alizarin red S plus e Alcian blue.



Fonte: Frizo, 2014.

4.5 Análise estatística.

Para análise dos resultados foi utilizado o nível de significância entre 1% e 5%. O teste de Bartlett foi usado para avaliar a homocedasticidade dos dados; a análise de variância ANOVA foi empregada para os dados paramétricos, seguida do teste Tukey-Kramer para comparações múltiplas em todos os experimentos realizados. Foi utilizado também o teste de Qui Quadrado para os resultados obtidos em porcentagem. Todos os dados foram avaliados em GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

Com a finalidade de facilitação na publicação científica futura deste trabalho, todas as Tabelas e Figuras estão formatadas e apresentadas no idioma inglês.

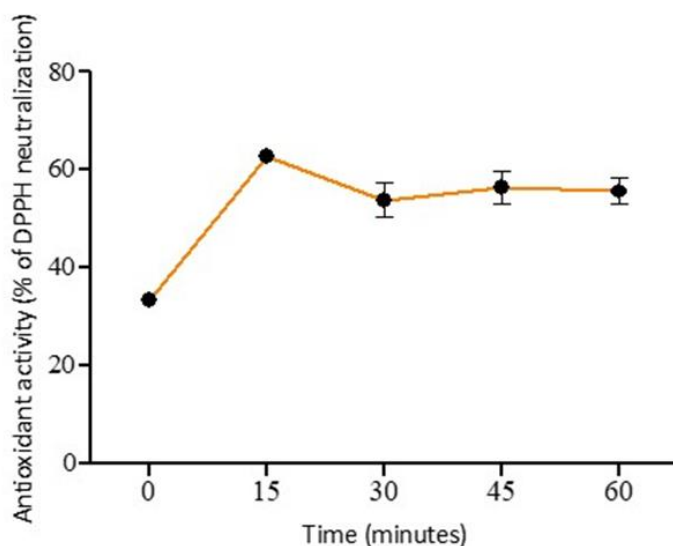
5.1 Caraterização nutricional do *Agaricus blazei*

A caracterização nutricional do *Agaricus blazei* liofilizado indica que as amostras apresentaram a seguinte composição: umidade ($11,65 \pm 3,3$ %), cinzas ($5,37 \pm 0,17\%$), lipídeos ($1,35 \pm 0,20$ %), proteínas ($35,5 \pm 3,2\%$), carboidratos ($46,13 \pm 1,7$ %), β -glucanas ($8,5$ g/Kg de cogumelo), compostos fenólicos ($1,25$ mg de ácido gálico/g amostra seca).

A redução do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) indicou presença de atividade antioxidante no *Agaricus blazei* (Figure 16).

Os resultados apresentados na Figura 16 indicam que o *Agaricus blazei* exibiu significativa capacidade de neutralizar o radical DPPH.

Figure 16 - Antioxidant activity of *Agaricus blazei*.

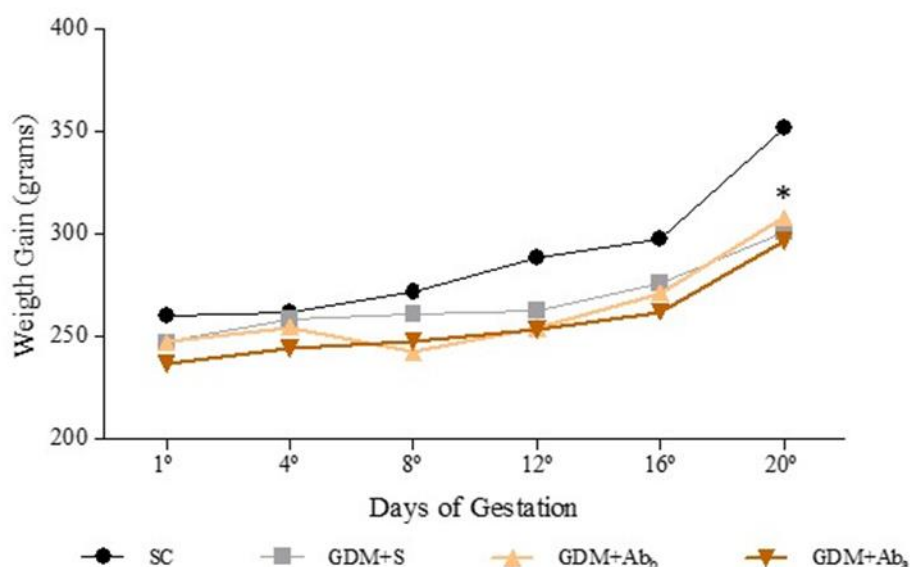


Essa neutralização foi melhor aos 15 minutos, atingindo aproximadamente de 60%. Em contrapartida, nos tempos de 30, 45 e 60 minutos, o cogumelo foi capaz de manter a atividade antioxidante em aproximadamente 55%.

5.2 Evolução gestacional e o desempenho reprodutivo de ratas GDM-STZ

Os resultados referentes à evolução do peso das ratas diabéticas expostas ao *Agaricus blazei* liofilizado e reconstituído durante o período de gestação estão representados na Figura 17. Observa-se que todos os animais com GDM-STZ apresentaram menor ganho de peso ao final da gestação comparados ao grupo SC ($F(7,58) = 0,05$).

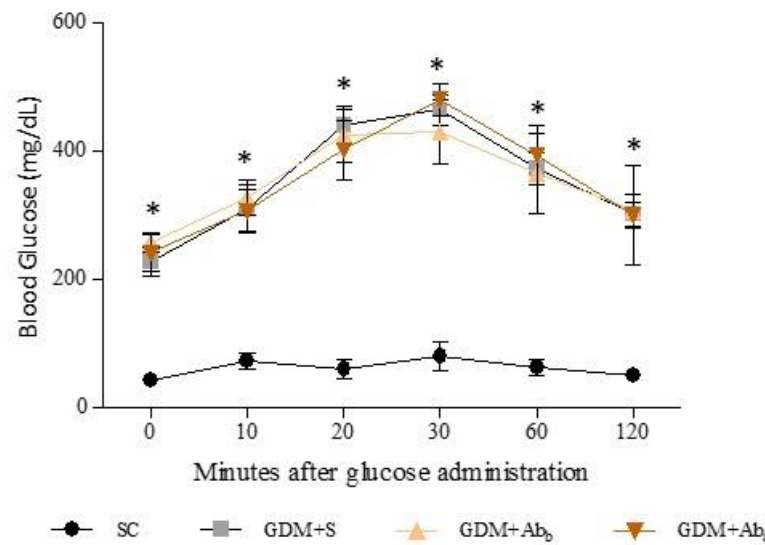
Figure 17 - Evolution of weights of pregnancy diabetic rats.



Note: SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 6$). * $p < 0.05$ in comparison to saline control group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

A Figura 18 ilustra os resultados do teste de tolerância oral à glicose de animais expostos ao *Agaricus blazei*. Todos os animais GDM tiveram aumento dos níveis de glicose, em todos os tempos avaliados, em relação ao grupo sem diabetes ($F(7,728) = 0,005$). Os dados encontrados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos de animais GDM.

Figure 18 - Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) on 17th day of gestation.

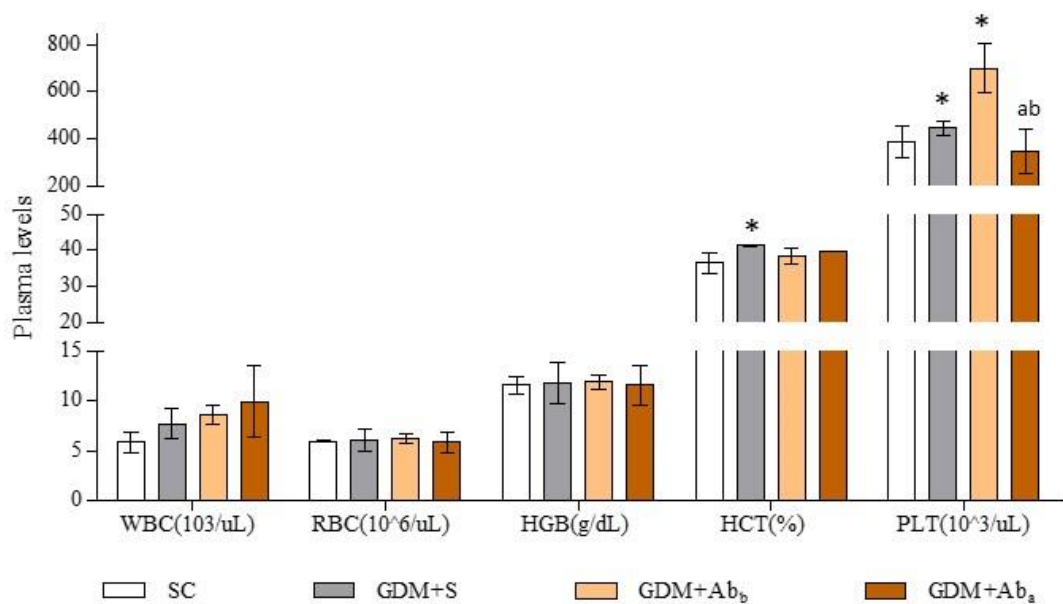


Note: SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). *p<0.05 in comparison to saline control group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Os índices hematológicos estão apresentados na Figura 19 e representam os valores de leucócitos (WBC), glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT) e plaquetas (PLT).

Não foram observadas alterações nos valores de WBC ($F(3,40) = 0,063$), RBC ($F(3,40) = 0,913$), HGB ($F(3,40) = 0,959$). Foram observado aumento de HCT ($F(3,40) = 0,047$) no grupo GDM+S em relação ao grupo SC.

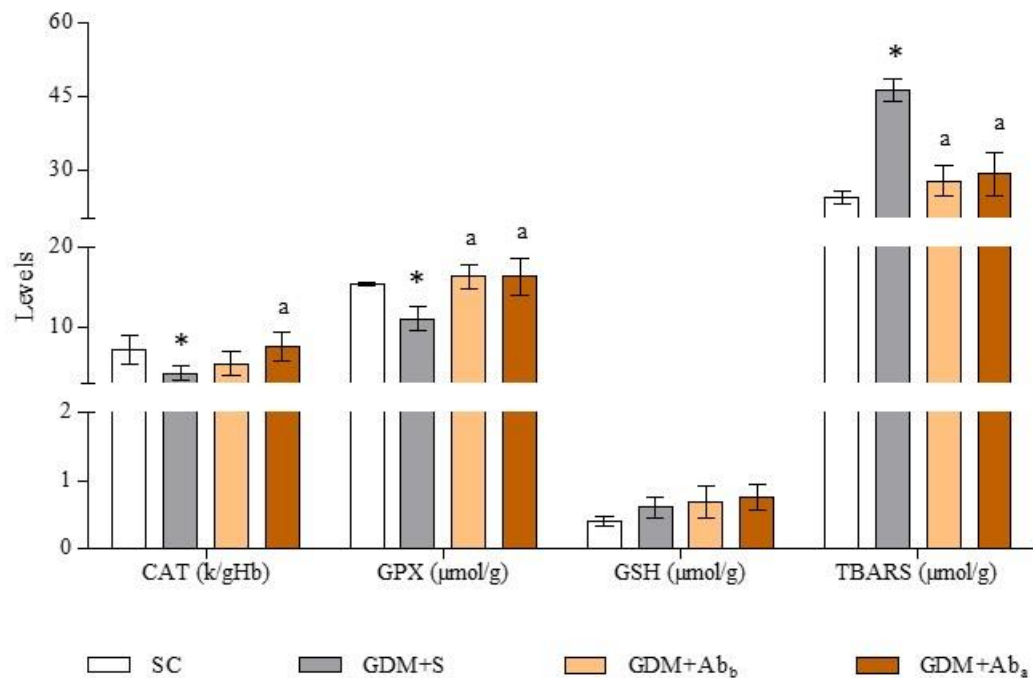
Observou-se um aumento de PLT ($F(3,40) = 0,0048$) nos grupos GDM+S e GDM+Ab_b em relação ao grupo SC, porém, no grupo GDM+Ab_a ocorreu uma diminuição deste parâmetro em relação ao GDM+S e ao grupo GDM+Ab_b.

Figure 19 - Hematological parameters.

Note: SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). WBC (Leukocyte), RBC (Red Blood Cells), HGB (Hemoglobin), HCT (Hematocrit), PLT (Platelet). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6) *p<0.05 in comparison to SC group, a in comparison to GDM+S, b in comparison to GDM+Ab_b, group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Os resultados referentes ao estado redox estão apresentados na Figura 20. Observou-se redução na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase (GPx), e aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no grupo GDM+S em relação ao grupo SC. Contrariamente, os grupos tratados com o cogumelo tiveram aumento das enzimas catalase, GPx e, redução da substância TBARS, em relação ao grupo GDM+S.

Figure 20 - Activity level of catalase, glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GSH), and TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) on plasma of pregnant rats.



Note: Saline Control (0.9% saline solution), GDM + Saline (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Abb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Aba (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). CAT: Catalase activity. GPX: Glutathione peroxidase activity. GSH: Reduced glutathione concentration. TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6) *p<0.05 in comparison to Saline Control group, a in comparison to GDM+Saline, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's

Na Tabela 1 estão descritas as dosagens bioquímicas realizadas no soro das ratas. Observa-se aumento na atividade das enzimas hepáticas ALT ($F(8,45) = 0,0019$) e AST ($F(8,45) = 0,0025$) no grupo GDM+S em relação ao grupo SC. Por outro lado, a exposição diária do *Agaricus blazei* promoveu redução significativa nas atividades de ALT e AST quando comparadas ao grupo GDM+S.

Table 1 - Serum biochemical parameters of pregnant rats.

Parameters	Groups			
	SC	GDM+S	GDM+Ab _b	GDM+Ab _a
ALT (U/L)	69.17 ± 7.11	178.83 ± 31.85*	127.00 ± 32.66 ^a	78.25 ± 9.54 ^a
AST (U/L)	95.60 ± 19.08	277.50 ± 55.19*	135.90 ± 73.72 ^a	96.33 ± 22.23 ^a
Albumin (g/dL)	3.79 ± 0.62	2.42 ± 0.47	2.95 ± 0.90	2.32 ± 0.29
Creatinine (mg/dL)	0.335 ± 0.04	0.173 ± 0.01	0.230 ± 0.12	0.240 ± 0.03
Urea (mg/dL)	38.15 ± 16.03	45.41 ± 9.89*	46.88 ± 7.60*	43.33 ± 4.76*
Cholesterol (mg/gL)	83,2 ± 14.81	136.94 ± 18.20*	82.92 ± 33.85 ^a	116.48 ± 15.08
HDL-Col (mg/gL)	54.83 ± 8.28	8.21 ± 2.24*	31.94 ± 4.35 ^{*a}	11.49 ± 5.44 ^{*a}
Tryglicerides (mg/gL)	765.15 ± 165.77	1813.45 ± 125.51*	1245.80 ± 202.23 ^a	1126.75 ± 156.37 ^a
Insulin (ng/mL)	2.616 ± 0.69	0.481 ± 0.16*	2.481 ± 0.66 ^a	0.897 ± 0.33 ^{*b}
Lipase	7.72 ± 0.61	7.18 ± 0.39	7.48 ± 1.18	7.11 ± 0.38
Glucose (mg/dL)	138.02 ± 31.70	471.06 ± 43.05*	194.82 ± 75.29 ^a	474.84 ± 58.32 ^{*b}

Note: SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). ALT (Alanine Aminotransferase), AST (Aspartate Aminotransferase). Data are presented as mean ± SD (n = 6) or percentage. *p<0.05 in comparison to Saline Control group, ^a in comparison to GDM+Saline group, ^b in comparison to GDM+ Ab_b group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Para avaliar o perfil renal foram mensuradas a albumina, creatinina e ureia. A ureia (F(5,18) = 0,0098), apresentou aumento significativo nos dois grupos tratados com *Agaricus blazei*.

Para avaliar o perfil lipídico foram mensurados o colesterol, HDL-colesterol e os triglicerídeos. Observou-se o aumento nos níveis séricos de colesterol (F(6,303) = 0,0095), e triglicerídeos (F(6,303) = 0,0036), nos animais do grupo GDM+S em relação ao grupo SC. No entanto, os níveis de colesterol e triglicérides apresentaram-se reduzidos no grupo GDM+Ab_b quando comparados ao comparados ao grupo GDM+S. O grupo GDM+Aba também apresentou redução dos níveis de triglicérides em relação ao grupo GDM+S.

A fração HDL-colesterol (F(6,306) = 0,0001) demonstra que todos os grupos apresentaram menores níveis para esse parâmetro quando comparados ao grupo SC. Por outro lado, estes valores se apresentaram aumentados nos dois grupos expostos ao *Agaricus blazei* em relação ao grupo GDM+S.

O perfil pancreático foi avaliado por meio dos parâmetros de insulina, de glicose e de lipase. No grupo GDM+S e no grupo GDM+Ab_a observou-se redução significativa nos níveis de insulina ($F(4,026) = 0,0001$), e aumento nos níveis de glicose ($F(4,026) = 0,0001$), quando comparados ao grupo SC. O mesmo resultado foi encontrado no grupo GDM+Ab_a quando comparado ao GDM+Ab_b. Entretanto, o grupo GDM+Ab_b apresentou aumento dos níveis de insulina ($F(4,026) = 0,554$) e redução dos níveis de glicose em relação ao grupo GDM+S. Com relação à atividade da lipase, não foram observadas diferenças entre os grupos.

Os resultados da capacidade reprodutiva estão apresentados na Tabela 2, em que se observa que houve um aumento significativo de perdas pós-implantação ($P = 0,0483$) do embrião em todos os grupos GDM em relação ao grupo SC. No entanto, em relação ao grupo GDM+S estas perdas foram menores nos grupos tratados com *Agaricus blazei*.

Table 2 - Reproductive capacity of female rats.

Parameters	Groups			
	SC	GDM+S	GDM+Ab _b	GDM+Ab _a
Post-implantation loss (%)	4.6	16*	11.62* ^a	8.16* ^a
Fetus weight (g)	2.19 ± 0.28	1.92 ± 0.16*	1.93 ± 0.28	1.99 ± 0.23*
Placenta weight (g)	0.415 ± 0.09	0.494 ± 0.143*	0.414 ± 0.107	0.508 ± 0.125*
Offspring vitality	9.75 ± 1.83	8.16 ± 1.53	9.75 ± 2.95	9.0 ± 2.61

Note: Saline Control (0.9% saline solution), GDM+Saline (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean ± SD (n = 6) or percentage. * $p < 0.05$ in comparison to Saline Control group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Ab_b group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Observou-se uma redução no peso de fetos ($F(9,961) = 0,0001$) nos grupos GDM+S e GDM+Ab_a, quando comparados ao grupo SC.

Os dados relacionados ao peso de placenta no GDM+S mostram aumento significativo quando comparado ao SC ($F(2,576) = 0,001$). Não houve diferença entre os grupos quanto aos fetos nascidos vivos ($F(2,129) = 0,8859$).

5.3 Desenvolvimento embriofetal

Na Tabela 3 estão descritos os resultados bioquímicos realizados no líquido amniótico de animais. Todos os grupos GDM, não apresentaram alterações nos níveis de ALT (F(3,404) = 0,0533), AST (F(3,404) = 0,095) e ureia (F(3,404) = 0,55). Entretanto, observa-se altos níveis de glicose (F(8,456) = 0,0025) e baixos níveis de insulina (F(8,456) = 0,0019).

Table 3 - Serum biochemical parameters of amniotic fluid.

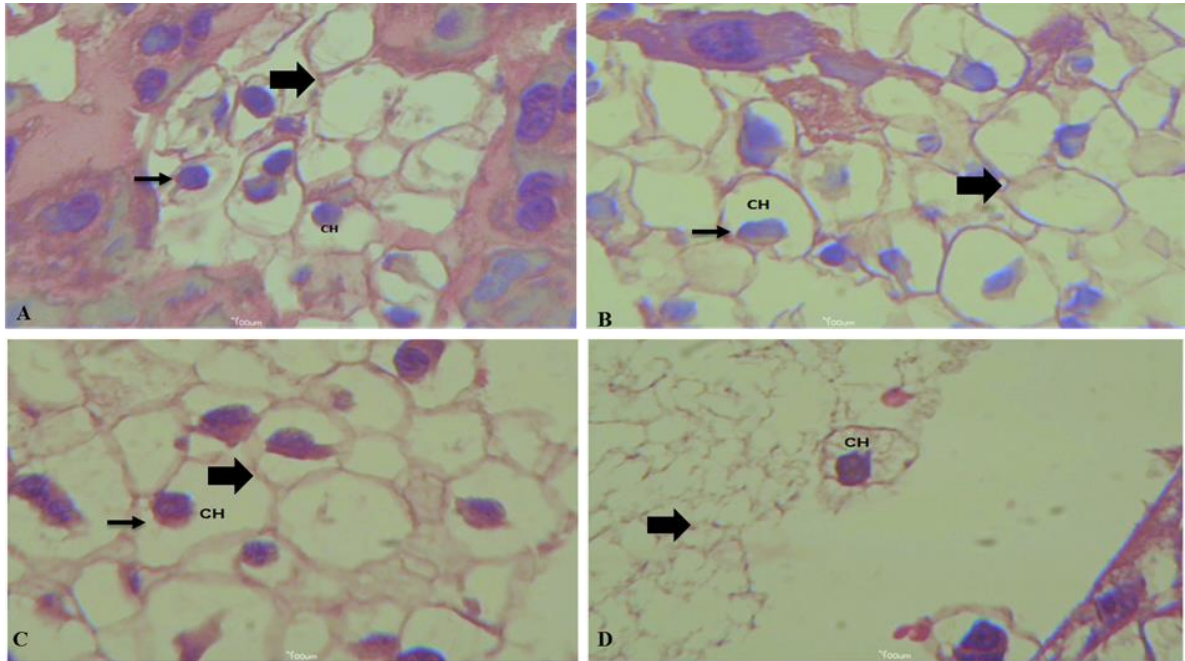
Parameters	Groups			
	SC	GDM+S	GDM+Ab _b	GDM+Ab _a
ALT (U/L)	0.77 ± 0.34	1.21 ± 0.46	0.80 ± 0.17	1.38 ± 1.10
AST (U/L)	15.03 ± 3.07	16.18 ± 3.91	13.52 ± 4.2	16.25 ± 1.69
Urea (mg/dL)	61.23 ± 10.9	50.78 ± 7.9	54.27 ± 1.21	48.07 ± 5.86
Insulin (ng/mL)	1.68 ± 0.84	0.64 ± 0.08*	0.71 ± 0.16*	0.77 ± 0.16*
Glucose (mg/dL)	41.19 ± 2.86	439.92 ± 48.29*	398.7 ± 70.70*	441.97 ± 55.17*

Note: Saline Control (0.9% saline solution), GDM+Saline (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). ALT (Alanine Aminotranferase), AST (Aspartate Aminotransferase). Data are presented as mean ± SD (n = 6) or percentage. *p<0.05 in comparison to Saline Control group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Ab_b group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Os resultados referentes à avaliação histológica da placenta estão apresentados na figura 21. O grupo SC apresenta células de Hofbauer normais (CH), sendo distinguidas pelo seu maior volume, forma esferoidal e citoplasma muitas vezes vacuolado, com núcleos corados (seta fina), sem lacunas intersticiais (seta), localizadas na decídua basal, evidenciando células de reação decidual com forma globosa e pouco corada, o grupo GDM+S, apresenta aumento do número e volume, em aproximadamente 20% das células de Hofbauer (CH), com núcleos corados (seta fina), sem lacunas intersticiais (seta), localizadas na decídua basal, evidenciando células de reação decidual com forma globosa e pouco coradas, o grupo GDM+Ab_b, apresenta aumento do volume, em aproximadamente 55%, das células de Hofbauer (CH), com núcleos corados (seta fina), sem lacunas intersticiais (seta), localizadas na decídua basal, evidenciando células de reação decidual com forma globosa e pouco coradas, o grupo GDM+Ab, observou-se presença de algumas células de Hofbauer intactas

(CH) e as demais rompidas (seta), localizadas na decídua basal, evidenciando células de reação decidual com forma globosa e pouco coradas.

Figure 21 - Photomicrography of Wistar rat placenta.



Note: (A) SC (0.9% saline solution), (B) GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), (C) GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), (D) GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean $\pm$ SD (n =6) or percentage. *p<0.05 in comparison to Saline Control group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+ Ab_b group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

Avaliação morfológica dos fetos está apresentada na Tabela 4. Não foram observadas anomalias externas, nos grupos avaliados. Quanto às medidas fetais, os resultados mostram que houve redução em todos os parâmetros avaliados ($F(8,561) = 0,0001$) no grupo GDM+S quando comparado ao grupo SC. Entretanto no grupo GDM+Ab_a apenas os parâmetros látero-lateral de tórax e crânio-caudal apresentaram-se reduzidos em relação ao grupo SC. Por outro lado, no grupo GDM+Ab_b observou-se aumento destes dois parâmetros em relação ao grupo GDM+S.

Os parâmetros crânio-caudal e cauda para os fetos dos grupos tratados com *Agaricus blazei*, também apresentam redução em relação ao grupo SC. Os grupos GDM não se observa alterações esqueléticas ($p>0,05$) quando comparados ao grupo SC, ou mesmo entre eles.

Table 4 - Morphological anomalies of fetuses.

Parameters	Groups			
	SC	GDM+S	GDM+Ab _b	GDM+Ab _a
External Abnormalities	0	0	0	0
External Measures				
Cranium Antero-posterior	13.15 ± 0.94	11.57 ± 1.29*	12.70 ± 0.86 ^a	12.62 ± 0.89 ^a
Cranium Latero-lateral	7.88 ± 0.43	7.00 ± 0.27*	7.67 ± 0.49 ^a	7.47 ± 0.71* ^a
Thorax Antero-posterior	10.03 ± 0.77	8.40 ± 1.57*	9.31 ± 0.70 ^a	8.83 ± 0.97*
Thorax Latero-lateral	8.87 ± 0.83	7.66 ± 1.77*	8.57 ± 0.59 ^a	7.85 ± 1.04 ^{ab}
Cranium-caudal	29.37 ± 1.29	27.10 ± 1.15*	27.58 ± 2.17*	27.74 ± 1.77*
Tail	11.21 ± 1.06	9.61 ± 1.32*	10.56 ± 0.85*	10.43 ± 0.94* ^a
Skeletal Abnormalities				
Skull - Parietal unossified area (%)	0	0	0	0
Sternebra Misshapen (%)	100	100	100	100
Absence of sternum (%)	0	0	0	0

Note: SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Ab_b (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 1 to 19), GDM+Ab_a (Diabetic+100 mg/kg/day of *Agaricus blazei* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean ± SD (n =15) or percentage. *p<0.05 in comparison to Saline Control group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+ Ab_b group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

6 DISCUSSÃO

Em geral, os cogumelos comestíveis consistem em alimentos de alto valor nutricional, e informações a respeito da composição destes fungos são essenciais para avaliar sua qualidade, uma vez que diferentes espécies e técnicas de cultivo podem influenciar diretamente na composição dos cogumelos.

Os cogumelos *in natura* apresentam teores de umidade que variaram entre 73,7 e 94,7%; Essas espécies de fungos macroscópicos são conhecidas por possuírem elevado teor de umidade, um dos fatores mais importantes quando se trata valor nutricional, pois este influencia diretamente na quantidade de matéria seca e, desta forma também na quantidade dos nutrientes presentes (VETTER 2003; MATTILA; SUOMPAA; PIIRONEN, 2000). Reis et al. (2012) apontaram que o *Agaricus blazei* pode apresentar teores de umidade superiores a 80%.

No presente estudo, trabalhou-se com amostras de cogumelo *Agaricus blazei* liofilizado que apresentou teor de umidade de $11,65 \pm 3,3\%$.

Os teores de cinzas no alimento representam seu conteúdo mineral, constituído de macronutrientes e micronutrientes, além de ser o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Os elementos fósforo, sódio e magnésio podem constituir cerca de 50 a 70% do teor total em cinzas dos cogumelos, enquanto o potássio, isoladamente, pode constituir 45% das cinzas totais (KALAČ, 2009; WANI et al., 2010). A quantidade de cinzas encontrada neste ensaio foi de $5,37 \pm 0,17\%$, inferiores a estudos com este cogumelo, em que descreveram-se variações nestes conteúdos entre 6,2 e 11,3% (PAULI, 2010; ORSINE; BRITO; NOVAES, 2012).

O *Agaricus blazei* liofilizado mostrou-se como uma importante fonte de proteínas. O teor encontrado foi de $35,5 \pm 3,2\%$, valor semelhante ao quantificado por Carneiro et al. (2013), ($31,29 \pm 1,85\%$), para a mesma espécie de cogumelo e superior aos valores normalmente encontrados para espécies como *Agaricus bisporus* (14,1%), *Lentinus edodes* (4,5%), *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eyngii* (7 e 11%, respectivamente), ficando atrás somente do *Pleurotus giganteus* (37,4%) (KALAČ, 2013; PHAN et al., 2012; REIS et al., 2012).

Além do alto teor proteico, os cogumelos são considerados fontes de proteínas de alto valor biológico, uma vez que possuem todos os aminoácidos essenciais, além de arginina e glutamina, dentre outros. Segundo Lemos (2009), os cogumelos são comparáveis, em termos nutricionais, com alimentos de origem animal com alto teor de proteínas, como a carne (25%),

leite (3%) e ovos (12%), além de apresentarem valores que se assemelham aos teores encontrados na soja (33 - 42%), podendo assim, ser adotados como fonte alternativa de proteína. Sabe-se, contudo, que a qualidade nutricional dos cogumelos pode variar em função da espécie, substratos de cultivo, condições ambientais assim como em função de linhagens diferentes de uma mesma espécie (FAN et al., 2007; SILVA et al., 2007; TORO et al., 2006).

De acordo com Furlani; Godoy (2007), os cogumelos apresentam baixos teores de lipídios (1,1 a 8,0%), na maioria das vezes uma quantidade inferior a 5% de seu peso seco. O ácido linoleico e o ácido oleico consistem nos ácidos graxos encontrados em maior concentração nestes alimentos (BARROS et al., 2008; KAVISHREE et al., 2008). O conteúdo em lipídios totais encontrados no presente nosso estudo foi de $1,35 \pm 0,20\%$, conforme esperado foi equivalente ao descrito por outros autores tanto para a mesma espécie de cogumelo, bem como para outras espécies (CARNEIRO et al., 2013; KALAČ, 2013; REIS et al., 2012).

Os carboidratos presentes nos cogumelos, apresentando teores que variam de 3 a 28%. Na maioria dos trabalhos descritos na literatura, o teor de carboidratos em cogumelos é calculado por diferença.

No presente estudo o cogumelo *Agaricus blazei* apresentou teor de $46,13 \pm 1,7\%$ para este nutriente. Este valor está abaixo ao encontrado por Carneiro et al. (2013) em estudo realizado com a mesma espécie de cogumelo ($59,42 \pm 1,86\%$) e por Liu et al. (2012) que estudaram diferentes espécies de cogumelos nos quais os valores ficaram em torno de (56 a 65%)

Esta diferença de 22% em relação ao observado por Carneiro et al. (2013), pode ser devido a forma de apresentação visto que o cogumelo avaliado pelos autores foi a porção interna de cápsulas de cogumelo comercializado na forma de suplemento. E o resultado inferior ao encontrado por Liu et al. (2012) provavelmente deve ao fato que no estudo em questão foram analisados outras espécies de cogumelos.

Contrariamente observamos valores superiores para este nutriente quando comparados aos encontrados por Helm; Coradin; Kestring em 2009 (32,98%), para a mesma espécie de cogumelo. Possivelmente tais resultados são decorrentes dos valores de fibra bruta utilizados para calcular os teores de carboidrato total, diferentemente do cálculo feito no presente estudo, que quantificou fibra separadamente.

Os principais polissacarídeos encontrados nos cogumelos são as β -glucanas, que compõem aproximadamente 50% da parede celular dos fungos. A concentração presente em cogumelos pode variar em função da espécie, condição de crescimento, pH do meio e

maturação do corpo frutífero (VALVERDE, HERNÁNDEZ-PEREZ, PAREDES-LÓPEZ, 2015; ROP; MLCEK; JURIKOVA, 2009).

O *Lentinus edodes* e alguns membros do gênero *Oyster* (*Pleurotus* spp.) foram reconhecidos como sendo algumas das fontes mais importantes de β -glucanas; em *Lentinus edodes*, *glucan lentinan* mostrou-se a substância eficaz, enquanto em Cogumelos ostra, a substância eficaz é chamada *pleuran*. (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000).

Park et al. (2003) determinaram a concentração de β -glucanas em cogumelos *Agaricus blazei* cultivados no Brasil e encontraram valores de 8,4 g/Kg em cogumelos cultivados em estufa e 10,1 g/Kg de cogumelo, cultivados no campo. A quantidade de β -glucanas encontrada no presente estudo foi de 8,5 g/Kg de cogumelo, equivalente ao descrito Park et al. (2003) e maior que o determinado por Bach (2017), 6,98 g/Kg de cogumelo.

Os cogumelos podem acumular variedade de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, que parecem ser os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos das espécies de cogumelos (OKE, ASLIM, 2011; SOUSA 2012). Em sua pesquisa, Dubost e Beelman (2007) encontraram valores de compostos fenólicos totais, ligeiramente maiores, para outras espécies de cogumelos (champignon de Paris (8,0 mgEAG/g), portobello (10,65 mgEAG/g), *lentinula edodes* (4,32 mgEAG/g).

Já Miranda (2015) encontrou valores superiores aos do presente estudo (7,68 mgEAG/g), para o cogumelo *Agaricus blazei*. Diferentemente Soares (2007) encontrou valores bem próximos aos da presente pesquisa para a mesma espécie de cogumelo. As diferenças de valores podem estar relacionadas a fatores como o clima, o substrato e o tempo de cultivo entre outros. Além disso, os compostos fenólicos são metabólitos secundários e, portanto, supõe-se que seus teores são influenciados pela agressão ambiental (PAULI, 2010).

Os oxidantes podem ser produzidos a taxas elevadas sob condições fisiopatológicas, provocando processos oxidativos (SIES, 1993). A maioria dos trabalhos envolvendo cogumelos comestíveis e atividades antioxidantes foram realizadas com o cogumelo *Agaricus blazei* na forma de extratos e utilização de solventes para extração de antioxidantes. No presente estudo a atividade antioxidante foi verificada sem adição de solvente na amostra de cogumelo. A porcentagem máxima de inibição do radical DPPH foi em torno de 60% no tempo de 15 minutos, reduzindo para 55% nos demais tempos, dados semelhantes foram encontrados por Mourão et al. (2011) que avaliaram a atividade antioxidante do cogumelo *Agaricus blazei* no tempo de 60 minutos (59 %), com extração por etanol. Tais resultados mostram que o cogumelo *Agaricus blazei* continha substâncias ativas, com alta capacidade de

doação de hidrogênio para eliminar os radicais do DPPH como um possível mecanismo para suas atividades antioxidantes.

O *Agaricus blazei* vem sendo utilizado em muitos tratamentos medicamentosos nas últimas décadas e, o número de estudos sobre os efeitos deste macrofungo na saúde humana vem aumentado significativamente (JI et al., 2014; KIM et al., 2005; LIMA et al., 2012; SONG et al., 2012). No entanto, o uso indiscriminado do *Agaricus blazei* associado às dietas ou sua utilização em tratamento de enfermidades têm evidenciado a necessidade de avaliação mais criteriosa sobre sua utilização, em relação à forma de administração, as definições de doses e a patologia a ser tratada (GONÇALVES et al., 2012; LIMA et al., 2012). Sendo assim, torna-se essencial verificar quais seriam os efeitos da administração do *Agaricus blazei* quanto à evolução gestacional e desempenho reprodutivo de ratas diabéticas.

Sabe-se que o desenvolvimento de diabetes é acompanhado de diminuições de peso (YURKIV et al., 2015). Os dados referentes ao ganho de peso mostram que todos os animais com GDM-STZ apresentaram redução do peso ao final da gestação, e a administração de cogumelo diariamente não foi capaz de reverter este parâmetro. Esta redução pode estar relacionada à deficiência de insulina responsável pela redução de processos anabólicos e aumento dos processos catabólicos, perda de glicose e água por meio da urina. Contribuindo para agravar a perda de peso (VOLPATO et al., 2008).

De acordo com as recomendações do Comitê de Especialistas da OMS sobre diabetes mellitus, é importante investigar a ação hipoglicemiante de produtos naturais que já foram originalmente usados na medicina tradicional (ALARCON-AGUILARA et al., 1998).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pelas propriedades de produtos naturais em retardar ou impedir a absorção de glicose no sangue; de modo que estas propriedades vêm sendo avaliadas em estudos com diabetes induzida por STZ e ação dos cogumelos (VINCENT et al., 2013; YANG et al., 2002; ZHANG; LIN, 2004).

Embora, no presente estudo o TOTG, não tenha demonstrado atividade antidiabética do cogumelo *Agaricus blazei*, pois os grupos tratados não apresentaram redução de glicemia nos tempos do teste, estudos realizados com diferentes espécies de cogumelos, incluindo o *Agaricus blazei*, demonstraram boa atividade hipoglicemiante com doses entre 200, 250 e 400 mg/kg, nas quais os cogumelos foram capazes de normalizar os níveis de glicose no sangue, porém nestes estudos não foram avaliados os efeitos tóxicos nas doses utilizadas (SINGH; BEDI; SHRI, 2017; RONY et al., 2013).

Na hiperglicemia, as células vermelhas e números de plaquetas podem estar alterados, sendo esta uma das alterações metabólicas mais importantes no diabetes. Os níveis

aumentados de hemoglobina e por consequência o aumento do hematócrito, sob a condição do diabetes, afeta a eficiência do transporte de oxigênio. Por outro lado, o aumento do número de plaquetas é capaz de causar eventos trombóticos arteriais (OH et al., 2010; SOARES et al., 2010; VITAK et al., 2015, VITAK et al., 2017).

No presente estudos não se observou aumento de hemoglobina nos animais GDM-STZ. Entretanto, nos animais GDM+S se observou um aumento de hematócrito. Nos animais GDM-STZ tratados com o *Agaricus blazei*, não foi observado o aumento de hematócrito em relação aos animais SC. Os animais GDM+S e GDM+Ab_b apresentaram aumento de número de plaquetas, enquanto que os animais GDM+Ab_a apresentaram uma redução deste parâmetro. Sabe-se que produtos com alto teor antioxidante, como é o caso do *Agaricus blazei*, são capazes de reduzir o número de plaquetas, entretanto se esse teor antioxidante for muito elevado ou o tempo de exposição for prolongado, o número de plaquetas pode aumentar (GALATI; O'BRIEN, 2004). Por outro lado, estudo feito por Vitak et al. (2017) com animais diabéticos mostrou que o *Agaricus blazei*, protegeu o sobre o sistema antioxidante dos eritrócitos e reduziu a apoptose dos glóbulos brancos, além da ausência de efeitos hematológicos tóxicos. Os resultados observados no presente estudo assemelham-se a estes achados, embora não tenham sido observadas alterações na série branca.

Concentrações excessivas de glicose plasmáticas e celulares promovem a intensificação da auto-oxidação. Esse é um dos mecanismos pelos quais os radicais livres se formam na hiperglicemia. O diabetes está geralmente associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), prejudicando o sistema de defesa antioxidante e, aumentando a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (RONY et al., 2013; VITAK et al., 2017).

O estresse oxidativo tem gerado interesse, principalmente, devido ao seu papel como principal contribuinte para desenvolvimento de diversas patologias com sérias implicações para a saúde pública, como diabetes, a obesidade e a aterosclerose entre outras (ANDREY; KUSHNAREVA; STARKOV, 2005).

No presente estudo observou-se redução das enzimas antioxidantes (catalase e a glutathione peroxidase - GPx) e, aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no grupo GDM+S em relação ao grupo SC, mostrando alta atividade dos EROs neste grupo em virtude da hiperglicemia.

Em contrapartida os grupos expostos ao *Agaricus blazei*, apresentaram aumento na produção das enzimas catalase e GPx em relação ao grupo GDM+S e, não houve diferença significativa, entre estes grupos e o grupo SC. Estas enzimas antioxidantes são capazes de

transformar H_2O_2 (poderoso agente oxidante), em água e oxigênio molecular. O aumento da catalase e da GPx pode estar relacionado também a presença de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos ou a presença de selênio, presentes neste cogumelo, uma vez que, a atividade da enzima GPx também depende de selênio.

A redução de TBARS nos grupos que expostos ao *Agaricus blazei* demonstra que os compostos fenólicos presentes no cogumelo são capazes de doar elétrons para o lipídio, evitando a formação de EROs (BAKALA et al., 2012; PÉRES et al., 2009; ZOUNR et al., 2018). Estudos realizados por Vitak et al. (2017) e Rony et al. (2013), apontam resultados semelhantes aos aqui encontrados, mostrando a importante atividade antioxidante dos cogumelos.

Em relação aos parâmetros hepáticos, os teores séricos de AST e ALT encontram-se significativamente elevados no grupo GDM+S em relação ao grupo SC. Sabe-se que essas enzimas estão elevadas em algumas doenças, como diabetes mellitus, hepatites infecciosas, cirrose hepática, hepatites e câncer de fígado (IDILIO et al., 2002; SCHINDHELM et al., 2006). As atividades de AST e ALT geralmente são aumentadas por alterações metabólicas no fígado, promovida pela administração de toxinas, quando da administração de STZ. Assim, os níveis de ALT e AST podem ser usados como biomarcador para monitorar a extensão da lesão hepática, em modelos animais diabéticos induzidos por STZ (OHAERI, 2001).

Os grupos que receberam *Agaricus blazei* tiveram os níveis de ALT e AST reduzidos em relação ao grupo GDM+S e, o grupo GDM+Ab_a mostrou níveis semelhantes ao do grupo SC. A redução na atividade destas enzimas poderia estar relacionada à prevenção no prejuízo oxidativo reduzindo os EROs, indicando possível efeito protetor deste cogumelo sobre as células hepáticas. Resultados semelhantes ao presente estudo foi encontrado por Cha et al. (2005) e Yang et al. (2002), que relataram em seus estudos que as atividades de AST e ALT foram significativamente reduzidas em ratos diabéticos STZ, tratados com diferentes espécies de cogumelos.

Na prática clínica, albumina, creatinina e ureia são consideradas parâmetros laboratoriais para avaliar a função renal (HENRY, 2008).

A hipoalbuminemia é um indicador de disfunção renal (ZARI; THEBAITI, 2018). E de acordo com Enemam et al. (2016) e Kaneko et al. (1997) a albumina é considerada proteína de fase aguda nas patologias, na qual os valores séricos possuem tendência a decrescer em condições inflamatórias causando hipoalbuminemia. A albumina é produzida pelo fígado é a proteína mais abundante no plasma, de modo que contribui em 80% para osmolaridade do plasma sanguíneo, além de ser importante reserva proteica AL-HASHEM, 2009). No presente

estudo foi evidenciado níveis de albumina reduzidos em todos os grupos em relação ao grupo SC, embora não apresente diferença estatisticamente significativa, mostra a presença de quadro patológico.

A creatinina é o produto residual da creatina, cujo catabolismo se dá em grande parte nas células musculares. É liberada ao plasma para ser posteriormente filtrada nos glomérulos e excretada na urina. Não foram encontradas diferenças nos níveis séricos deste marcador entre os grupos saudáveis e diabéticos.

A ureia, por sua vez, é uma das principais substâncias nitrogenadas do organismo, sendo sintetizada no fígado a partir de CO₂ e amônia. Após sua síntese é liberada na corrente sanguínea, seguindo até os rins, onde é filtrada pelos glomérulos (HENRY, 2008; SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Nossos resultados indicaram aumento dos níveis de ureia nos grupos GDM expostos ao *Agaricus blazei*. Como este cogumelo é rico em proteínas, este aumento poderia estar relacionado a este fator.

O diabetes é uma patologia metabólica que promove aumento de colesterol e triglicérides e, a redução de HDL-Col. Os animais GDM+S, apresentaram este perfil. O *Agaricus blazei* quando administrado antes da STZ promoveu a redução de colesterol, redução de triglicérides e aumento de HDL-Col, enquanto que quando administrado após a STZ promoveu redução de triglicérides e aumento de HDL-Col.

Alguns alimentos estão intimamente relacionados à redução significativa nos níveis séricos do colesterol promovendo alteração no metabolismo de lipídios. É relatado que a adição de cogumelos na alimentação promove a redução dos níveis plasmáticos de colesterol e previne o desenvolvimento de ateromas. Essa ação hipocolesterolêmica pode ser devida às quantidades de fibras e beta-glucanas presentes nos cogumelos, as quais promovem sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória (MASCARO et al., 2014; SAHYOUN et al., 2006; SPIM et al., 2017). Nossos resultados corroboram os descritos por Cha et al. (2005), Fukushima et al. (2000), Mascaro et al. (2014) e Spim et al. (2017), em estudos com os cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*.

A STZ inibe a secreção de insulina pelo pâncreas, visto que destrói seletivamente as células β pancreáticas (TAKASU et al., 1991). O grupo GDM+S apresentou aumento de glicose e redução dos níveis de insulina. O grupo GDM+Ab_b mostrou redução de glicose plasmática e aumento síntese de insulina em relação ao grupo GDM+S. Já o grupo GDM+Ab_a manteve os baixos níveis de insulina e altos níveis de glicose, assemelhando-se ao grupo GDM+S. Os resultados do presente estudo sugerem que o *Agaricus blazei* quando administrado antes da STZ, promoveu reparos aos danos causados nas células β pancreáticas,

promovendo a síntese de insulina e baixando o nível de glicose no plasma, atuando como protetor. Nossos resultados corroboram com os encontrados na literatura; Vincent et al. (2013) em estudo feito com o *Agaricus blazei* relatando resultados semelhantes. E assemelham-se aos achados por Rony et al. (2013) que descreveram estudos histopatológico do pâncreas no qual encontraram extenso danos nas células β pancreáticas, como a diminuição do número de células de ilhotas (necrose celular), o que indicou ação citotóxica da STZ medida pela formação de EROS.

A taxa de perdas pós-implantação refere-se à relação entre o número de blastocistos implantados e aqueles que não conseguiram se desenvolver; representa tanto o aumento das reabsorções, bem como o nascimento de fetos mortos, e indicam falha no desenvolvimento do embrião (LIMA, 2014). De acordo com Cristiane et al. (2008), esse período é caracterizado por intensa proliferação celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo e é considerado o período de maior suscetibilidade à ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, no qual o maior número de malformações pode ser induzido.

Os animais GDM apresentaram aumento de perdas pós-implantação, contudo os grupos expostos ao *Agaricus blazei*, apresentaram redução destas perdas em relação ao grupo GDM+S. O alto índice destas perdas pode estar correlacionado à toxicidade da glicose em altas concentrações causando impacto à viabilidade fetal (JOVANOVIC et al., 2005).

Stedile et al. (2015) realizaram estudo com ratas Wistar prenhes tratadas com 0,5 mg de β -glucanas associado com 10 mg/kg de itraconazol, durante 21 dias, e observaram que a taxa de perdas pós-implantação foi significativamente maior nos animais tratados com β -glucanas, tanto isolada, como com associação com itraconazol. O papel de β -glucanas não está totalmente esclarecido, contudo, sabe-se que o sistema endócrino e imunológico interage intensivamente durante a implantação e a manutenção da gestação. O aumento da atividade das células NK (Natural killer) está associado ao aumento das taxas de reabsorção fetal, visto que a β -glucana, presente *Agaricus blazei* pode aumentar a atividade das células NK (PELIZON et al., 2005).

Em relação ao peso de fetos verificou-se em todos os grupos este parâmetro reduzido quando comparados ao grupo SC. Esta redução pode estar relacionada a um possível efeito tóxico da STZ e a presença de hiperglicemia materna que causou diabetes severo (glicemia superior a 300 mg/dL) (MASCHIO et al., 2017).

A placenta é um dos órgãos mais importantes para avaliação toxicológica de riscos para mães e fetos, pois atua como interface entre eles (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). O crescimento e a função da placenta desempenham papel importante

na manutenção da gravidez, influenciando o crescimento e desenvolvimento fetal (FURUKAWA et al., 2014). No presente estudo foi evidenciado aumento de peso das placentas no grupo GDM+S e GDM+ Ab_a comparados ao SC, similarmente, ratas com diabetes grave induzido pela administração de streptozotocin também tiveram placentomegalia (VOLPATO et al., 2001; SOUZA et al., 2009).

Contrariamente nos grupos que receberam *Agaricus blazei* antes da indução do diabetes não tiveram diferença estatística, mostrando uma possível proteção do cogumelo.

O resultado referente à histologia da placenta demonstrou aumento das células de Hofbauer nos grupos GDM+S e GDM+ Ab_b comparados ao grupo SC. Este aumento poderia ser um mecanismo compensatório na tentativa de garantir as trocas maternas fetais e o suprimento nutricional ao feto em desenvolvimento (CALDERON et al., 1999). De acordo com Khan et al. (2000) células de Hofbauer conhecidas como macrófagos fetais são as células predominantes no estroma das vilosidades coriônicas da placenta durante toda gestação. Estas células desempenham um papel central no desenvolvimento e manutenção da placenta, pois secretam citocinas importantes para o crescimento e diferenciação do trofoblasto. Diferentemente o grupo GDM+ Ab_a, apresentaram redução e rompimento das células de Hofbauer, mostrando que o cogumelo *Agaricus blazei* administrado após a indução do diabetes sugere ser capaz de proteger as células dos efeitos tóxicos na STZ. Estudos mais aprofundados precisam ser realizados devido ao rompimento identificado nas células de Hofbauer.

Embora tenham sido encontradas alterações nas perdas pós-implantação, peso de fetos e placenta, vale ressaltar que a dose experimental do *Agaricus blazei* estudadas, não promoveu alterações na vitalidade fetal.

O líquido amniótico é o principal reservatório de substâncias exógenas do feto, sendo também a maior via de excreção de substâncias por ele deglutidas, as quais são filtradas pelo rim fetal, retornando à mãe pela artéria umbilical (BURDON et al., 2007). Entre as suas principais funções destacam-se a proteção do embrião de traumatismos sofridos pela mãe; barreira contra infecções; auxílio no controle da temperatura corporal do embrião; o crescimento externo simétrico do embrião; impede a aderência entre o embrião e o âmnio; e permite que o feto se mova livremente, contribuindo assim para o desenvolvimento muscular (TONG et al., 2009).

No presente estudo verificou-se redução nos níveis de insulina e aumento da glicose no líquido amniótico em todos os grupos em relação ao SC. Este resultado pode estar relacionado à alta exposição à glicose, durante o TOTG, pois o ambiente metabólico anormal

provocado pela hiperglicemia, com a exposição à glicose, causando tolerância a glicose diminuída tem impacto significativo na gravidez e no feto (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2008; YANG et al., 2002). Não foram observadas alterações nos outros parâmetros relacionados à dosagem bioquímica no líquido amniótico.

A hiperglicemia severa durante a gravidez é um dos principais fatores responsáveis pela hiperglicemia fetal, causando retardo no crescimento fetal, que também podem estar relacionada ao estresse oxidativo e às alterações no ambiente intrauterino (HAROUN, 2017; WEINERT et al., 2011).

No presente estudo, fetos de mães GDM+S apresentaram redução de medidas morfológicas externas, resultados compatíveis com GDM+STZ grave. Nos grupos tratados com *Agaricus blazei*, ocorreu aumento nos parâmetros crânio e tórax, e aumento de cauda no grupo GDM+Ab_a quando comparado ao GDM+S. Não foram observadas anormalidades externas e esqueléticas indicando possível efeito protetor do cogumelo *Agaricus blazei*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes pré-clínicos empregados para a avaliação da administração diária de *Agaricus blazei* no diabetes mellitus gestacional de ratas induzido por estreptozotocina (GDM-STZ) sugerem potencialidade como alimento funcional. A caracterização nutricional do cogumelo indicou importante atividade antioxidante. Além disto, o cogumelo promoveu melhora no desempenho reprodutivo de ratas GMD-STZ e não interferiu com o desenvolvimento intrauterino dos fetos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p.121-126, 1984.
- ALARCON-AGUILARA, F. J et al. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as Antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 61, p. 101–110, 1998.
- AL-HASHEM, F. Camel's milk protects against aluminum chloride-induced toxicity in the liver and kidney of white albino rats. **American journal of biochemistry and biotechnology**, v. 5, n.3, p. 98-108, 2009.
- AMAZONAS, M. A. L. **Agaricus brasiliensis (= Agaricus blazei ss. Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identidade taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, Brasília, DF. Anais. Embrapa, p. 78-80, 2004.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Gestational diabetes mellitus**. **Diabetes Care**, v. 27, n.1, p. 88-90, 2004.
- ANDREY, A.Y; KUSHNAREVA, Y. E; STARKOV, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 200-214, 2005.
- ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada, RDC nº. 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Vegetais, Produtos de Frutas e Cogumelos Comestíveis. Brasília, 2005.
- ANVISA. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e, ou, de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em Julho de 2008.
- AQUINO, M. M. A et al. Revendo diabetes e gravidez. **Revista Ciências Médica**, v. 12, n. 1, p. 99-106, 2003.
- ASKOY, N et al. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 25, p. 625-630, 2005.
- BACH, F. **Avaliação do potencial nutricional, antioxidante e antibacteriano de cogumelos comestíveis**. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, UFRP, 2017.
- BAKALA, H et al. Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 18, p. 1527–1534, 2012.
- BALASUBASHINI, M. S et al. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 310-314, 2004.

BARROS, L et al. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 61-66, 2008.

BARROS, L et al. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1076–1079, 2009.

BASHO, S. M; BIN, M. C. Propriedade dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v. 4, n. 1, p. 48-58, 2010.

BERNARDSHAW, S et al. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei murill* differentially stimulates production of proinflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells in vitro. **Inflammation**, v. 29, n. 4, p. 147-153, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, V. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n.º 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília-DF, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC Nº 272. Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de setembro, 2005.

BURDON, C et al. Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptoses in the murine placenta. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 724-733, 2007.

CALDERON, M. P et al. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas e relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intrauterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, v. 21, n. 5, p. 91-8, 1999.

CARNEIRO, A. A. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2168–2173, 2013.

CHA, J, Y et al. Hypoglycemic and Antioxidative Effects of Fermented Chaga Mushroom (*nonotus obliquus*) on Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Journal of Life Science**, v. 15, n. 5, p. 809-818, 2005.

CHANDRA, L. C et al. Differential effects of shiitake - and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3074-3080, 2011.

CHRISTINE, F; SKIBOLA- MARTYN, T. SMITH. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 3/4, p. 375–383, 2000.

CRISTIANE, V; AMARAL, D. S; PEREIRA, G. Ketoconazole and fluconazole-induced embryotoxicity and skeletal anomalies in Wistar rats: a comparative study. **Brazilian Dallegrove**, v. 51, p. 1153-1161, 2008.

DE MELLO, M et al. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. **Physiol Chem Phys Med NMR**, v. 33, n. 1, p. 63–71, 2001.

DA DELFINO, V et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina : comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31–36, 2002.

DIAS, E. S et al. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola**. v. 61, n. 5, p. 545–549, 2004.

DOĞAN, H. H. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activities and fatty acid composition of *Amanita ovoidea* (Bull.) Link. in Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 87–93, 2013.

DUBOST, N. J et al. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v.105, n. 2, p. 727–735, 2007.

EIRA, A. F; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico: prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. 2º ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais PAF; FCA, UNESP, 115p, 1997.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n.1, p. 70-77, 1959.

EMBRAPA. RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Brasil e China vão intensificar cooperação para aumentar a produção e consumo de cogumelos, 2009.

ENEMAM , B et al. Platelet abnormalities in nephrotic syndrome. **Pediatric Nephrology**, v. 31, n. 8, p. 1267-79, 2016.

FAN, L et al. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exopolysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n.1, p. 30-35, 2007.

FIRENZUOLI, F; GORI, L; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *A. blazei*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2007.

FRIZO, I. Efeitos do Cogumelo *Lentinula edodes* (shiitake) na exposição materno-fetal ao Metotrexato. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Sorocaba, UNISO, Sorocaba, 2014.

FRIZO, I et al. Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake). **Reproductive Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 25–25, 2014.

FUKUSHIMA, M et al. Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2151-2156, 2000.

FURLANI, R. P. Z; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

FURUKAWA, S et al. Effect of chlorpromazine on rat placenta development. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p. 41-47, 2014.

FURUKAWA, S; KURODA, Y; SUGIYAMA, A. A. comparison of the histological structure of the placenta in the experimental animals. **Journal of Toxicology Patology**, v. 27, n. 5, p. 11-18, 2014.

GALATI, J; O'BRIEN, P. J. potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287 – 303, 2004.

GALINDO, V et al. **Definição, diagnóstico e classificação dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, diabetes mellitus**. 1º ed. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006.

GAMARANO, L; FRAIGE FILHO, F. Alimentos Funcionais no tratamento do Diabetes mellitus. **Qualidade em Alimentação: Nutrição**, v. 19, n.1, p. 20-21, 2004.

GERENUTTI, M et al. Safety Assessment of the Royal Sun Mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher Basidiomycetes) Intake during Rat Pregnancy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 6, p. 519–528, 2014.

GERENUTTI, M; DEL FIOL, F; GROppo, F. C. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. **Die Pharmazie**, v. 61, n. 1, p. 79-80, 2006.

GOMES, D. Informações sobre cogumelos comestíveis. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, n. 2, p. 1-5, 2013.

GONÇALVES, J. L et al. Pro-inflammatory effects of the mushroom *Agaricus blazei* and its consequences on atherosclerosis development. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 927-937, 2012.

GROSS, J. L et al. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Diabetes Care**, v. 28, p. 176–188, 2005.

HAROUN, H. S. W. Intrauterine Growth Restriction. **Anatomy Physiology & biochemistry International Journal**, v. 1, n. 5, 2017.

HELM, C. V; CORADIN, J. H; KESTRING, D. R. Avaliação da composição química dos cogumelos comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus Portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. **Embrapa**, 2009.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20^{ed}. Barueri, São Paulo: Manole, 2008.

IDILIO, Z. J et al. A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 39, n. 1, p. 22-26, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4^{ed}, 2008.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DIABETES IN PREGNANCY STUDY GROUPS, 2010.

ISHIKAWA, N.K; KASUYA, M. C. M; VANETTI, M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 206-210, 2001.

ITOH, A et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 983-987, 2010.

ITOH, A et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1215-1219, 2009.

JAYAKUMAR, T et al. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Food Research International**. v. 44, n. 4, p. 851–861, 2011.

Jl, W et al. Protective Effect of *Agaricus brasiliensis* on STZ-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, n. 4, p. 1-6, 2014.

JOVANOVIĆ, L. Elevated pregnancy losses at high and low extremes of maternal glucose in early normal and diabetic pregnancy. **Diabetes Care**, v. 28, n. 5, p. 1113-1117, 2005.

KALAČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209–218, 2013.

KALÁČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 9-16, 2009.

KAVISHREE, S et al. Fat and fatty acids in Indian edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 597-602, 2008.

KANEKO, J. J et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6° ed. San Diego: Academic Press, 1997.

KHAN, S et al. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 1075-83, 2000.

KIM, Y.W et al. Anti-diabetic activity of b-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 7, p. 483–487, 2005.

LAWRANCE, C et al. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3074-3080, 2011.

LEMOS, F. M. R. **Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 147 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

LIMA, C. U. J. O et al. *Agaricus blazei* Murrill and inflammatory mediators in elderly women: a randomized clinical trial. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 3, p. 336-341, 2012.

LIMA, C. S. **Estudo da toxicidade não clínica em ratos submetidos ao tratamento com óleo resina de *Copaifera duckei* Dwyer (subcrônico e reprodutivo)**. 266 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, UNIFAP, 2014.

LIU, Y. T et al. Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1238–1244, 2012.

LOBO, V et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOGUERCIO-LEITE, C et al. A particularidade de ser um fungo – constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-27, 2006.

MA, H. T et al. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry, Journal** **Phytochemistry**, v. 114, p. 109-13, 2015.

MASCHIO, B. H et al. Protocolos perinatais empregados para a avaliação do diabetes mellitus gestacional induzido por estreptozotocina em ratas. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 5, n. 1, p. 76–95, 2017.

MANZI, P et al . Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MANZI, P; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 315–318, 2000.

MASCARO, M. B et al. Effects of Dietary Supplementation with *Agaricus sylvaticus* Schaeffer on Glycemia and Cholesterol after Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, n.1, p. 1-10, 2014.

MATTILA, P; SUONPAA, K; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, v. 16, n. 7, p. 694-696, 2000.

MAZZA, G. **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. 1° ed. Technomic Publishing, Lancaster, 1998.

METZGER, B. E et al. Summary and recommendations of the fifth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. 251, 2007.

MIRANDA, A. M. **Agaricus brasiliensis (Cogumelo do Sol): caracterização química e efeitos sobre o perfil de genes relacionados à homeostase do colesterol em ratos**. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas Área de Concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica), Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, 2015.

MOLLER, N. P et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171–182, 2008.

MOURÃO, F. Antioxidant activity of *agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 197-202, 2011.

NIWA, A et al. Ipomoea batatas and *Agaricus blazei* ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potential in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 3, p.194-202, 2011.

NYAM, K. L; CHOW, C. F; TAN, C. S; NG, S. T. Antidiabetic Properties of the Tiger's Milk Medicinal Mushroom, *Lignosus rhinocerotis* (Agaricomycetes), in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, n. 7, p. 607-617, 2017.

OH, T. W et al. Semipurified Fractions from the Submerged-Culture Broth of *Agaricus blazei* Murill Reduce Blood Glucose Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Journal of Agricultural and Food**, v. 58, p. 4113–4119, 2010.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OHAERI, O. C. Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. **Bioscience Reports**, v. 21, n. 1, p. 19-24, 2001.

OKE, F; ASLIM, B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 613-619, 2011.

ORSINE, J. V. C; BRITO, L. M; NOVAIS, M. R. C. M. Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e farmacológicas. **Revista do Hospital de Clínicas e da Faculdade de Medicina Publica**, v. 32, n. 4, p. 452-460, 2012.

PAGLIA, D. E; VALENTINE, W. E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v.70, n. 1, p. 158-69, 1967.

PALACIOS, I et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 674–678, 2011.

PANHWAR, K. Q; MEMON, S. Synthesis of Cr(III)-Morin Complex: Characterization and Antioxidant Study. **The Scientific World Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2014.

PARK, Y. K et al. determinação da concentração de β -glucanas em cogumelo agaricus blazei murill por método enzimático. **ciências de tecnologia de alimentos**, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

PAULI, A. P. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, 2010.

PELIZON, C et al. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiological Research**, v. 54, n. 5, p. 557-564, 2005.

PÉRES, M. M; ZULET, M. A; MARTINEZ, J. A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p.771–779, 2009.

PHAN, C. W et al. *Pleurotus giganteus* (Berk) Karunarathna & K. D. Hyde: nutritional value and in vitro neurite outgrowth activity in rat pheochromocytoma cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 102, p. 1-30, 2012.

RAHAR, S et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. Journal of advanced. **Pharmaceutical Technology Research**, v.2, n. 2, p. 94-103, 2011.

- RAMIREZ-ANGUIANO, A. C et al. Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. **Journal of the Scienci of Food and Agriculture**, v. 87, n.12, p. 2272–2278, 2007.
- READER, D. M. Medical nutrition therapy and lifestyle interventions. **Diabetes Care**, v.30, n. 2, p.188-93, 2007.
- REIS, F. S et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2012.
- REIS, F. S et al. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, n. 2, p. 91–98, 2013.
- RIEF, P et al. The AST/ALT (De-Ritis) ratio A novel marker for critical limb ischemia in peripheral arterial occlusive disease patients. **Medicine**, v. 95, n. 24, p. 1–4, 2016.
- RONY, K . A et al. The Medicinal Cracked-Cap Polypore Mushroom *Phellinus rimosus* (Higher Basidiomycetes) Attenuates Alloxan-Induced Hyperglycemia and Oxidative Stress in Rats. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 3, p. 287–300, 2013.
- ROP, O; MLCEK, J; JURIKOVA, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 11, p. 624–631, 2009.
- SAHYOUN, N. R et al. American Whole-grain intake is inversely associated with the. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 1, p. 124–131, 2006.
- SAPATA, M et al. **Processamento mínimo de cogumelos do género pleurotus**, v. 32, n. 2, p. 1-32, 2005.
- SASIDHARAN, S et al. In vitro antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4478-4489, 2010.
- SCALBERT, A; MONTIES, B; JANIN, G. Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1324–1329, 1989.
- SCHINDHELM, R. K et al. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 22, n. 6, p. 437–443, 2006.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p .213–219, 1993.

SILVA, E. G et al. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 27, n. 1, p.72-75, 2007.

SINGH, V; BEDI, G. K; SHRI, R. In Vitro and In Vivo Antidiabetic Evaluation of Selected Culinary-Medicinal Mushrooms (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2017.

SOARES, A. A. **Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill**. 56f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2007.

SOARES, A. L et al. Alterações do sistema hemostático nos pacientes com diabetes melito tipo 2. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6 , p. 482-488, 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição da PUCCAMP**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Diabetes mellitus gestacional, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 6, p. 1-5, 2008.

SODRÉ, F. L; COSTA, J. C. B; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SONG, H. H et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Agaricus blazei* extract in bone marrow-derived mast cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 40, n. 5, p. 1073-1084, 2012.

SORIMACHI, K et al. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *A. blazei* fractions *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 2, p. 103-108, 2001.

SOUSA, J. M. S. **Análise de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos aquosos de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil**. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2012.

SOUZA, M. S. S. Effects of cigarette smoke exposure on pregnancy outcome and offspring of diabetic rats. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 8, n. 4, p. 562–567, 2009.

SPIM, S. R. V et al. Effects os *Lentinula edodes* conmmption on biochemical, hematologic na oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 7, p. 2255-2264, 2017.

STEDILE, R et al. Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie, v. 43, n. 13, p. 1-12, 2015.

STRINGHETA, P. C et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

TAKASU, N et al. STZ and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. **Diabetes**, v. 40, p. 1141–1145, 1991.

TANAKA, K et al. Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. **Cancer Science**, v. 102, n. 3, p. 516-521, 2011.

TOLOSA, E. M et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2º ed. São Paulo: Manole, 2003.

TOMA, A et al. Antidiabetic activities of aqueous ethanol and n-butanol fraction of *Moringa stenopetala* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 242, p. 242, 2015.

TONG, X. L et al. Potential function of amniotic fluid in fetal development novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 72, n. 7, p. 368-373, 2009.

TORO, G. V et al. Biological quality of protein from three strains of *Pleurotus* spp. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 494-497, 2006.

TURKOGLU, A et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 267-273, 2007.

VALVERDE, M. E; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, v. 7, n. 14, p. 1–14, 2015.

VAZ, J. A et al. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 610–616, 2011.

VETTER, J. Chemical composition of fresh and conserved *Agaricus bisporus* mushroom. **European Food Research Technology**, v. 217, n. 1, p. 10-12, 2003.

VINCENT, M et al. Dietary supplementation with *Agaricus blazei* Murrill extract prevents diet-induced obesity and insulin resistance in rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 3, p. 553-61, 2013.

VITAK, T. Y et al. The effect of the medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) on the erythron system in normal and

streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.7, n. 3, p. 277–86, 2015.

VITAK, T. Y et al. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 8, n. 5, p. 187-201, 2017.

VOLPATO, G. T et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Ethnopharmacol**, v. 116, n.1, p. 131-7, 2008.

VOLPATO, G. T. Repercussões maternas, reprodutivas e perinatais do tratamento com o extrato aquoso de folhas de *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca) na prenhez de ratas não-diabéticas e diabéticas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 23, n. 6, p. 1-15, 2001.

WANG, X. M et al. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. **Food Chemistry**, v. 151, n. 15, p. 279–285, 2014.

WANI, B. A et al. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 24, p. 2598-2604, 2010.

WASSER, S.P et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 3, p. 267-290, 2002.

WEINERT, L. S et al. Gestational diabetes management: a multidisciplinary treatment algorithm. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 7, p. 1-5, 2011.

WILDMAN, R. E. **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**. 2° ed. Flórida: Robert wildmam, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy**. Geneva: WHO, 2013.

WU, T; XU, B. Antidiabetic and antioxidant activities of eight medicinal mushroom species from China. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 2, p. 129-40, 2015.

XI, M et al. Antioxidant and antiglycation properties of total saponins extracted from traditional Chinese medicine used to treat diabetes mellitus. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 2, p. 228–37, 2010.

YANG, Q et al. HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 167-72, 2010.

YANG, B. K et al. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exo-polymer produced from a submerged mycelial culture. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 937-42, 2002.

YOSHIOKA, Y et al. Low-molecular-weight lignin-rich fraction in the extract of cultured *Lentinula edodes mycelia* attenuates carbon tetrachloride-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. **Journal of Natural medicines**, v. 66, n. 1, p. 185-191, 2012.

YURKIV, B. The Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* Medicinal Mushroom Administration on the L-arginine/Nitric Oxide System and Rat Leukocyte Apoptosis in Experimental Type 1 Diabetes mellitus. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.17, n. 4, p. 339-50, 2015.

ZARI, T. A; THEBAITI, M. A. A. Effects of *Caralluma russeliana* stem extract on some physiological parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 619–631, 2018.

ZHANG, C et al. Antioxidation, anti-hyperglycaemia and renoprotective effects of extracellular polysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, n. 5, p. 219-228, 2018.

ZHANG, H. N; LIN,Z.B. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* .Acta Pharmacol Sin. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 25, n. 2, p. 191-195, 2004.

ZHAO, J. D; ZHANG, X. Q. Importance, distribution and taxonomy of Ganodermataceae in China. Proceedings of Contributed Symposium, B 5th International Mycological congress, v. 18, n. 3, p 326-382, 1994.

ZOGNO, M. A; MIGLINO, M. A; OLIVEIRA, M. F. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animmal Scienci**, v. 41, n. 4, p. 228-235, 2004.

ZOUNR, R. A et al. Determination of Selenium and Arsenic Ions in Edible Mushroom Samples by Novel Chloride–Oxalic Acid Deep Eutectic Solvent Extraction Using Graphite Furnace-Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Aoac International**, v. 101, n. 2, p. 593-600, 2018.

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO EM CEUA-UNISO.

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

Protocolo nº 089/2016
Interessado (a): Marli Gerenutti
Orientador (a): Marli Gerenutti
Título do Projeto: Ensaios Pré-Clínicos com os Cogumelos <i>Agaricus blazei</i> , <i>Lentinula edodes</i> e <i>Ganoderma lucidum</i> , visando a redução e danos maternos e fetais causados pelo 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

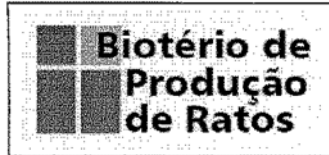
Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 11/08/2016

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

ANEXO B - ATESTADO DE SAÚDE ANIMAL.



Universidade de São Paulo
 Instituto de Ciências Biomédicas – ICB
 Biotério de Produção de Ratos
 Av Prof Lineu Prestes, 2048 CEP: 05508-000.
 Cidade Universitária - São Paulo – SP
 Tel: 3091-8491 3091 0889
 E-mail: renaider@usp.br

ORIGEM: Biotério de Produção de Ratos	SEQUÊNCIAS: 50364
ESPÉCIE: <i>Rattus norvegicus</i>	LINHAGEM: Wistar / SHR / WKY
NÚMERO DE ANIMAIS/SEXO: 10 Machos	IDADE: Adultos

PROTOCOLO DE MONITORAMENTO DE SAÚDE – BACTERIOLÓGICO

Foram coletadas amostras de fezes do jejuno, ceco e intestino grosso, bem como amostras da orofaringe, semeadas em meios seletivos, incubadas por 24-48 horas a 37° C, em aerobiose e anaerobiose.

MICROORGANISMOS PESQUISADOS	AMOSTRA	RESULTADO	MÉTODO
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	PCR
<i>Citrobacter rodentium</i>	Traqueia/orofaringe/ trato	Negativo	Cultura
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	Cultura
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Traqueia/orofaringe/ trato	Negativo	Cultura
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia/orofaringe/ trato	Negativo	Cultura
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	PCR
<i>Pasteurella multocida</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	Cultura
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	PCR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Traqueia/orofaringe/ Trato	Negativo	Cultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	Cultura
<i>Streptococcus β hemolítico</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	Cultura
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Traqueia/orofaringe	Negativo	Cultura
<i>Salmonella</i> spp.	Trato gastrointestinal	Negativo	Cultura
<i>Helicobacter</i> spp.	Trato gastrointestinal	Negativo	PCR
<i>Car bacillus</i>	Soro	Negativo	ELISA
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Soro	Negativo	ELISA
<i>Clostridium piliforme</i>	Soro	Negativo	ELISA

Outros microrganismos isolados: *Aerococcus viridans*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas fluorescens*.

PROTOCOLO DE MONITORAMENTO DE SAÚDE – VIROLÓGICO

Foram coletadas amostras de sangue via punção cardíaca para obtenção de soro a ser testado para presença de anticorpos.

VÍRUS	RESULTADOS	LABORATÓRIO	MÉTODO
Kilham rat virus (KRV)	Negativo	LCSA – ICB	ELISA
Pneumonia virus of rat	Negativo	LCSA – ICB	ELISA
Reovirus (REO)	Negativo	LCSA – ICB	ELISA

PROTOCOLO DE MONITORAMENTO DE SAÚDE – PARASITOLÓGICO

MICROORGANISMOS PESQUISADOS	AMOSTRA	RESULTADO	MÉTODO
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Chilomastix bennettii</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Cryptosporidium</i> sp	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Eimeria</i> sp	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Entamoeba</i> sp	Fezes	Positivo	Microscopia
<i>Giardia muris</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Hymenolepis nana</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Spironucleus muris</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Syphacia</i> sp	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Tritrichomonas muris</i>	Fezes	Negativo	Microscopia
<i>Demodex musculi</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Myobia musculi</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Myocoptes musculinus</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Notoedres muris</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Ornithonyssus bacoti</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Polyplax</i> sp	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Psorergates simplex</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia
<i>Trichoecius rombotsi</i>	Pêlo	Negativo	Microscopia

Responsável Bacteriológico - Cyntia M. S. C. de Godoy - CRBio – 31131/01

Responsável Parasitológico - Robison José da Cruz - CRBio - 33762/01

Responsável Sorologia – Agtha de Alencar Muniz Chaves – CRBio 054385-8


Renáide Rodrigues Ferreira Gacek

Bióloga Responsável – Biotério de Produção de Ratos

CRBio 43739/01D

ANEXO C - RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO INTERNACIONAL.



ANEXO D - RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO INTERNACIONAL.

