

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

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

Fabia Judice Marques Viroel

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DO COGUMELO MEDICINAL *Ganoderma lucidum*
(Higher Basidiomycetes): EVIDÊNCIAS NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL

Sorocaba/SP

2018

Fabia Judice Marques Viroel

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DO COGUMELO MEDICINAL *Ganoderma lucidum*
(Higher Basidiomycetes): EVIDÊNCIAS NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL**

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

2018

Fabia Judice Marques Viroel

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DO COGUMELO MEDICINAL *Ganoderma lucidum*
(Higher Basidiomycetes): EVIDÊNCIAS NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL.**

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. Ana Carolina Rusca Correa Porto
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Alexandre Hataka
Universidade Estadual Paulista – Unesp- Botucatu

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, com todo meu carinho e com imensa saudade, ao meu pai Antônio Mauro de Moraes Marques.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso teria sido possível.

À minha orientadora, professora Marli Gerenutti, excelente profissional com quem aprendi muito. Obrigada por toda paciência e ensinamentos.

À professora Denise Grotto, por todo incentivo, colaboração e auxílio na execução desse trabalho. Meu muito obrigado.

À professora Ângela Jozala, pelo apoio e me ensinar enxergar as coisas de modo mais fácil.

Ao professor Alexandre Hataka pelo valioso tempo dispendido e imensa contribuição neste trabalho.

À Thaísa, pela prontidão na ajuda nas atividades do laboratório e pela amizade.

À minha querida amiga Letícia, que juntas descobrimos o verdadeiro valor da parceria, amizade e companheirismo.

Ao time de alunos de iniciação científica, Lucas, Mirela e Veronika, meu muito obrigada, a ajuda de vocês foi muito importante para mim.

Ao meu sogro Joaquim e minha sogra Zuleika, não tenho palavras para agradecer todo apoio que me deram, todo amor e atenção com meus pequenos na minha ausência.

À minha mãe Vanda, que sempre me encorajou e acreditou em mim.

Ao meu marido Gustavo, pela confiança, suporte e amor. Talvez você não saiba o que fez nem como ajudou, mas para mim foi muito importante.

Aos meus amados filhos, Letícia e Lucas, por serem a energia que me estimula a seguir em frente e por tornarem minha vida mais doce e feliz.

Aos meus amigos e familiares pelo apoio em todos os momentos.

Aos animais, parte fundamental para desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada pelas suas contribuições à ciência.

À Fapesp pelo apoio financeiro (Processo 2015/24566-9), à Finep (Processo 01.10.0659.00), ao Prosup-Capes pela bolsa de estudos.

EPÍGRAFE

**“Deus nunca disse que a jornada seria fácil;
mas Ele disse que a chegada valeria a pena”
(Max Lucado)**

RESUMO

Introdução: Em humanos, os aumentos das taxas de morbidade e mortalidade materna e perinatal estão associados ao número crescente de Diabetes Mellitus Gestacional (GDM). Mães diabéticas sem tratamento durante a gravidez possuem maiores chances de terem filhos com problemas cardíacos e respiratórios, icterícia, episódios de hipoglicemia após parto e morte uterina. Após GDM, a mulher e o filho estão mais suscetíveis a desenvolverem diabetes ao longo de suas vidas. O uso de alimentos funcionais parecem ser fatores importantes no controle desse tipo de diabetes, e podem trazer potenciais benefícios à saúde materno-fetal. **Objetivo:** Avaliar por meio de ensaio pré-clínico *in vivo* o desenvolvimento materno-fetal no Diabetes Mellitus Gestacional induzido por estreptozotocina (GDM-STZ), quando da exposição materna durante o período gestacional ao cogumelo culinário-medicinal *Ganoderma lucidum* (Gl) **Material e Métodos:** Ratas Wistar prenhes foram expostas ao pó liofilizado reconstituído de *Gl* antes e após a indução do GDM-STZ (dose única de 40mg/kg, IV) no oitavo dia de gestação; foram realizados teste oral de tolerância à glicose, avaliações bioquímicas (ALT, AST, CK, Ureia, Creatinina, Albumina, Colesterol, HDL-Col e Triglicérides), avaliações hematológicas, avaliações de estresse oxidativo, análise do desempenho reprodutivo das ratas, avaliações morfométricas de fetos; análises histológicas materna (fígado, pâncreas e rim) e fetal (medida de hipocampo e córtex). **Resultados:** O *Gl* reduziu resposta glicêmica no teste oral de tolerância à glicose, entretanto não alterou a glicemia e os níveis de insulina materna e fetal; promoveu diminuição dos valores de AST e CK materno e CK placentário e fetal. No estresse oxidativo houve melhora dos níveis de catalase e malondialdeído com o uso do *Gl* administrado após a STZ e ainda diminuiu triglicérides séricos. Os fetos das ratas expostas ao *Gl* mostraram maiores medidas fetais de cabeça, tórax, craniocaudal e cauda, mantiveram a medida do hipocampo semelhante ao grupo controle. As ratas não apresentaram melhora na capacidade reprodutiva. **Conclusão:** Os resultados maternos e fetais obtidos até presente momento indicam que o *Ganoderma lucidum* na dose empregada, antes ou após a indução do GMD-STZ possui promissor potencial nutricional e medicinal na evolução da gestação e possui feitos protetores sobre os fetos.

Palavras-Chave: Toxicologia da reprodução. Desenvolvimento pré-natal. Diabetes Mellitus Gestacional. *Ganoderma lucidum*. Estresse oxidativo. Teste oral de tolerância à glicose.

ABSTRACT

Introduction: In humans, increases in maternal and perinatal morbidity and mortality rates are associated with increasing numbers of Gestational Diabetes Mellitus (GDM). Untreated diabetic mothers are more likely to have children with heart and respiratory problems, jaundice, episodes of postpartum hypoglycemia, and uterine death. After GDM, the woman and the child are more susceptible to developing diabetes throughout their lives. The use of functional foods seem to be important factors in the control of this type of diabetes, and may bring potential benefits to maternal-fetal health. **Aim:** To evaluate the maternal-fetal development in streptozotocin-induced Gestational Diabetes Mellitus (GDM-STZ) through *in vivo* pre-clinical trials in maternal exposure to the culinary-medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* during the gestational period. **Methods:** Pregnant Wistar rats were exposed to reconstituted lyophilized powder of *Ganoderma lucidum* before and after induction of GDM-STZ (single dose 40mg/kg, IV) on the eighth pregnancy day; were assessed: biochemical parameters (ALT, AST, CK, Urea, Creatinine, Albumin, Cholesterol, HDL-Col and Triglycerides), hematological and oxidative stress evaluations, reproductive performance analysis, morphometric evaluation of fetuses; maternal (liver, pancreas, and kidney) and fetal (hippocampal and cortex) histological analyzes. **Results:** GI reduced glycemic response in the oral glucose tolerance test, however did not alter glycemia and maternal and fetal insulin levels; decreased AST and maternal CK and placental and fetal CK values. In oxidative stress there was an improvement in the levels of catalase and malondialdehyde with the use of GI administered after the STZ and still decreased serum triglycerides. Fetuses from rats exposed to GI showed greater fetal measurements of head, thorax, craniocaudal and tail, maintained the hippocampus measurement similar to the control group. The rats showed no improvement in reproductive capacity. **Conclusion:** Maternal and fetal results obtained so far indicate that *Ganoderma lucidum* at the dose used, before or after the induction of GMD-STZ has a promising nutritional and medicinal potential in the evolution of gestation and has protective effects on fetuses.

Key-words: Reproductive toxicology. Prenatal development. Gestational Diabetes Mellitus. *Ganoderma lucidum*. Oxidative stress. Oral glucose tolerance test.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma do estudo.16
- Figura 2 - *Ganoderma lucidum*.17
- Figura 3 - Isoladores micro ambientais Alesco® para alojamento dos animais.18
- Figura 4 - Presença de espermatozoides no lavado vaginal de rata Wistar como indicativo do primeiro dia de gestação.18
- Figura 5 - Divisão dos grupos após confirmação da prenhez.19
- Figura 6 - Indução do diabetes pela administração de STZ na veia caudal.20
- Figura 7 - Aferição da glicemia após 48h da indução do GDM-STZ via punção de vaso periférico do pavilhão auricular.21
- Figura 8 - Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG) com monitoramento de 2 horas das ratas GDM-STZ.21
- Figura 9 - Procedimento metodológico utilizado para a avaliação da capacidade reprodutiva de ratas.26
- Figura 10 - Ovários com corpos lúteos e corpos lúteos retirados dos ovários.27
- Figura 11 - Procedimento para a coleta de líquido amniótico do saco gestacional.28
- Figura 12 - Procedimento empregado para a análise das medidas fetais externas.28
- Figura 13 - Feto diafanizado e corado com Alizarin red S plus e Alcian blue 30
- Figura 14 - Quantitative analysis of the islets of Langerhans in GDM-STZ rats.33
- Figura 15 - The evolution of GDM-STZ.35
- Figura 16 - Biochemical in GDM-STZ of maternal serum.37
- Figura 17 – Histological sections of kidneys and maternal livers 38
- Figura 18 - Oxidative stress of maternal plasma and placenta of pregnant rats GDM-STZ treated with *Ganoderma lucidum*.40
- Figura 19 - Fetal measurements.41
- Figura 20 - Fetal Glomerulus Count.42
- Figura 21 - Measurement of hippocampus and fetal cortex.43
- Figura 22 - Biochemical in GDM-STZ in placenta and amniotic fluid.44

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotranferase

AST - Aspartato aminotranferase

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

CK - Creatina quinase

DM - Diabetes Mellitus

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

GDM - Diabetes Mellitus Gestacional

GDM-Gla - Diabetes Mellitus Gestacional mais *Ganoderma lucidum* depois da STZ

GDM-Glb - Diabetes Mellitus Gestacional mais *Ganoderma lucidum* antes da STZ

GDM-SC - Diabetes Mellitus Gestacional *controle salina*

GDM-STZ - Diabetes Mellitus Gestacional induzida por estreptozotocina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

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

Gl - *Ganoderma lucidum*

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

Hb - Hemoglobina

HCL - Ácido clorídrico

HDL-col - Lipoproteína de alta densidade

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

HTC – Hematócrito

IP - Intraperitoneal

IV - Intravenosa

KCl - Cloreto de potássio

KOH - Hidróxido de potássio

LAPETOX - Laboratório de Pesquisas Toxicológicas

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MDA - Malondialdeído

mM - Milimolar

NaOH - Hidróxido de sódio

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotido fosfato

nm - Nanômetro

OH - Radical hidroxila

O₂ - Oxigênio

PLT - Número de plaquetas

RBC - Contagem total de eritrócitos

rpm - Rotação por minuto

SC – Controle salina

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SOD - Superóxido dismutase

STZ- Estreptozotocina

TAS - Tampão acetato de sódio

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TFK - Tampão fosfato de potássio

TG – Triglicérides

TOTG - Teste Oral de Tolerância à Glicose

UNISO – Universidade de Sorocaba

WBC - Contagem total de Leucócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Delineamento Experimental	15
3.2	<i>Ganoderma lucidum</i>	16
3.2.1	Obtenção do pó liofilizado do cogumelo	16
3.2.2	Dosagens de compostos fenólicos e β -glucanas	17
3.3	Animais	17
3.4	Acasalamento e Prenhez	18
3.5	Escolha da dose e exposição ao cogumelo	19
3.6	Indução e Acompanhamento do Diabetes Mellitus Gestacional (GDM-STZ)	20
3.6.1	Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	21
3.7	Procedimento de Cesárea	22
3.8	Avaliação Materna	22
3.8.1	Análise Hematológica Materna	22
3.8.2	Análises Bioquímicas	22
3.8.3	Avaliação de Estresse oxidativo	23
3.8.4	Avaliação Histológica Materna	24
3.9	Avaliação da Capacidade Reprodutiva	25
3.10	Desenvolvimento embrionário e análise placentária	27
3.10.1	Coleta e processamento de líquido amniótico	27
3.10.2	Avaliação morfológica fetal	28
3.10.3	Processamento da placenta	30
3.11	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Determinação de β-glucanas e Compostos Fenólicos	32
4.2	Acompanhamento do GDM-STZ	32
4.2.1	Avaliação histológica do pâncreas materno e perfil glicêmico no GDM-STZ	32
4.2.2	Avaliação hematológica, bioquímica e histológica de rim e fígado de ratas GDM-STZ	36
4.3	Avaliação da Capacidade Reprodutiva	38
4.4	Avaliação do estado redox no GMD-STZ	39

4.5 Avaliação do desenvolvimento intrauterino de ratos expostos à estreptozotocina40

4.6 Avaliação placentária e do líquido amniótico43

5 DISCUSSÃO46

6 CONCLUSÃO52

REFERÊNCIAS52

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO EM CEUA-UNISO58

ANEXO B - ATESTADO DE SAÚDE ANIMAL59

ANEXO C - RESUMO APRESENTADO EM CONGRESSO INTERNACIONAL61

ANEXO D - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO EM REVISTA63

1 INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença endócrina crônico-degenerativa caracterizada pela diminuição da secreção de insulina pelo pâncreas (tipo 1) ou o aumento na resistência a insulina pelas células do organismo (tipo 2), ocasionando aumento de glicose no sangue. Alterações crônico-degenerativas como do DM podem causar complicações metabólicas em vários sistemas do organismo, tais como: nefropatia, retinopatia, neuropatias, eventos cardiovasculares e cerebrovasculares em pacientes diabéticos (GROSS et al., 2005).

Dados da OMS (Organização Mundial da Saúde) preveem elevação do número de diabéticos de 171 milhões no ano de 2000, para 336 milhões em 2030, neste aumento, um grupo especial de diabéticos, o Diabetes Mellitus Gestacional (GDM), vem preocupando os setores de Saúde Pública (GALINDO, V; CAVALCANTI, N; LYRA, 2006).

O Diabetes Mellitus Gestacional (GDM) vem sendo tratado como um problema global de saúde das gestantes e no Brasil a prevalência dessa doença no Sistema Único de Saúde (SUS) é de aproximadamente 18% (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; MINISTÉRIO, 2017).

A etiologia desse tipo de diabetes ainda é desconhecida, entretanto de acordo com Amâncio, Cristina e Mendonça (2013) existem algumas hipóteses que podem explicar este tipo de DM: (1) Alterações hormonais na gestação – no período gestacional é produzida na placenta uma grande quantidade de hormônios, como o estrogênio, progesterona e a somatotrofina coriônica humana, ambas são importantes para o desenvolvimento fetal e podem interferir na ação da insulina no organismo materno, funcionando como antagonistas da ação da insulina, causando aumento na resistência à insulina; (2): Fatores genéticos – como o diabetes gestacional é caracterizado por uma resistência à insulina semelhante a que ocorre no diabetes tipo 2, as mulheres que desenvolvem diabetes durante a gestação têm maior probabilidade de algum dia vir a desenvolver o diabetes tipo 2; (3) Obesidade – diabetes

gestacional é mais comum em grupos onde a obesidade está presente, podendo desencadear tanto o diabetes gestacional quanto o diabetes tipo 2.

A gestante portadora de GDM não tratada tem maior risco de rotura prematura de membranas e parto pré-maturo, apresentação pélvica fetal e feto macrossômico (YANG et al., 2002). Condições como hipóxia, infecção e diabetes durante a gestação estão associadas às mudanças na vascularização placentária e nas células trofoblásticas, gerando assim insultos no meio intrauterino que interrompem o desenvolvimento fetal normal (MCMULLEN et al., 2004).

No feto humano, além da macrosomia, os riscos para o desenvolvimento de síndrome da angustia respiratória, cardiomiopatia, icterícia, hipoglicemia ao nascer, hipocalcemia, hipomagnesemia e policitemia com hiperviscosidade sanguínea encontram-se fortemente aumentados (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

Anomalias congênitas frequentemente encontradas em conceitos de mães diabéticas incluem as malformações do sistema nervoso central, sistemas cardiovascular, digestório, urogenital e esquelético (MOLEY KH., 1999).

Neste contexto, o acompanhamento de gestantes com GDM é muito importante e deve incluir o controle metabólico mediante ajustes na dieta, exercício físico e uso de insulina, quando necessário (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Metzger (2007) e Reader (2007) acreditaram que a terapia nutricional é a primeira opção como tratamento para a grande maioria das gestantes com GDM.

A insulina de uma maneira geral só é introduzida quando a dieta e o exercício não levam a um controle metabólico (AQUINO et al., 2003). Sendo assim, o primeiro tratamento preconizado para a GDM como forma de controlar a glicemia nessas pacientes é a dieta, pois o exercício físico nem sempre é bem tolerado em algumas gestantes, principalmente aquelas com excesso de

peso, restando a dieta como uma ferramenta importantíssima. Os alimentos naturais com alto teor de substâncias antioxidantes e atividade hipoglicemiante têm sido alvo de estudo de muitos pesquisadores, visando diminuição dos radicais livres e o nível de glicose sanguínea em pacientes com DM, na tentativa de reduzir os danos metabólicos no organismo (WU; XU, 2015; XI et al., 2010). Esta busca por alimentos funcionais, como os cogumelos, vem ganhando adeptos em toda parte do mundo e muitos estudos têm relatado suas propriedades medicinais e nutricionais nas patologias metabólicas.

Oyetayo (2011) em seu artigo de revisão relata que pesquisadores nigerianos têm coletado informações importantes sobre o uso tradicional e medicinal dos cogumelos, e destacam a utilização do cogumelo *Ganoderma lucidum* e seus efeitos benéficos no tratamento de diabetes. Países orientais como Japão, China e Coréia há centenas de anos usam o *Ganoderma lucidum* como alimento funcional, pois possui propriedades antioxidantes, hipoglicemiantes, diminuem os níveis de colesterol e triglicerídeos (TG), rejuvenescedor, anticancerígeno e ainda para tratamento de muitas enfermidades como bronquite crônica, hepatite, hipertensão e desordens imunológicas (LIN, 2001).

A espécie de cogumelo *Ganoderma lucidum*, possui uma variedade de moléculas bioativas em suas constituições como, por exemplo, triterpenóides, polissacarídeos, nucleotídeos, ácidos graxos, glicoproteínas, esteróis, esteroides, proteínas e peptídeos (BATRA; SHARMA; KHAJURIA, 2013; WACHTEL-GALOR et al., 2011).

Estudos demonstraram que as moléculas bioativas do cogumelo *Ganoderma lucidum* possuem propriedades anticâncer, anti-diabetogênica, anti-hepatotóxica e imunomodulatória (BOH, 2013; BOH et al., 2007; PATERSON, 2006). Chen et al. (2017) isolaram sete novos compostos do corpo frutífero do *Ganoderma lucidum* e em seus ensaios de bioatividade, forneceram evidências para o uso deste cogumelo como planta medicinal no controle da glicemia e atividade anticâncer.

Este trabalho propõe análises pré-natais, com a utilização de parâmetros de acompanhamento gestacional e de desenvolvimento fetal para investigar o potencial deste cogumelo em possuir atividade de prevenção dos efeitos deletérios da GDM induzido pela estreptozotocina (GDM-STZ).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo busca avaliar os efeitos do *Ganoderma lucidum* sobre o diabetes mellitus gestacional de ratas induzido por estreptozotocina (GDM-STZ) – considerando-se suas potencialidades nutricionais e medicinais.

2.2 Objetivos específicos

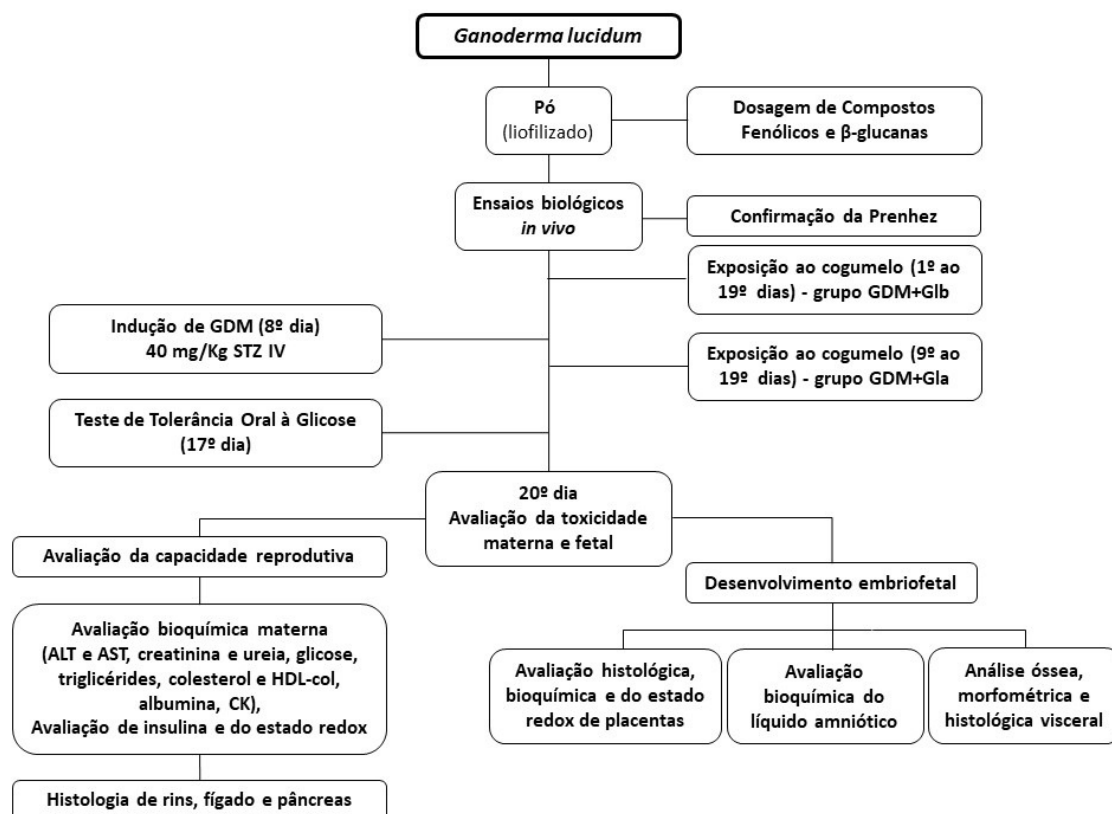
- Avaliar os efeitos do *Ganoderma lucidum* na evolução gestacional e no desempenho reprodutivo de ratas GDM-STZ.
- Avaliar os efeitos do *Ganoderma lucidum* sobre o desenvolvimento intrauterino de ratos expostos à estreptozotocina, por meio de análises placentárias, fetais e de líquido amniótico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Foi realizado um ensaio pré-clínico *in vivo* com ratas GDM-STZ expostas ao cogumelo *Ganoderma lucidum* (Gl) onde o fluxograma do estudo está ilustrado na Figura 1. O estudo 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 financeiro da Fapesp (Processo 2015/24566-9).

Figura 1 -Fluxograma do estudo.

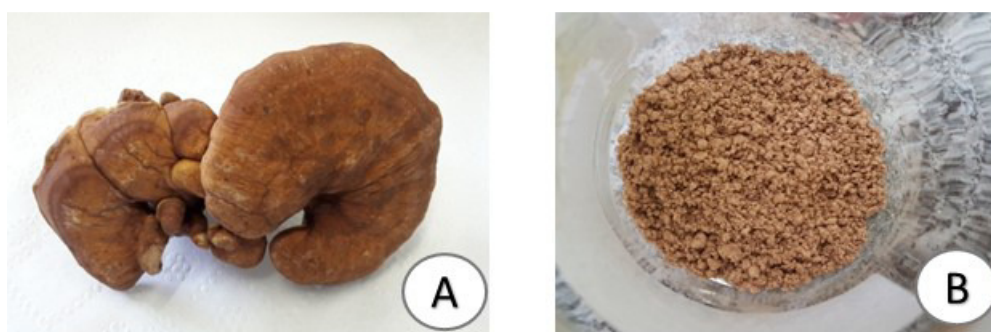


Fonte: Elaboração própria.

3.2 *Ganoderma lucidum*

3.2.1 Obtenção do pó liofilizado do cogumelo

As amostras *in natura* do cogumelo *Ganoderma lucidum* (Figura 2), adquiridas comercialmente, foram fragmentadas de maneira homogênea, armazenadas em biofreezer a -80°C (REVCO® ULT-1386-3-D) por um período de aproximadamente 24 h; o material congelado foi liofilizado em Liofilizador - Termo Savant, LK-40, 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 para serem suspensas em água. O pó tamisado foi acondicionado em embalagens plásticas herméticas mantidas em dessecador.

Figura 2 - *Ganoderma lucidum*.

Nota: A: *in natura*. B: Liofilizado e moído.

Fonte: Elaboração própria.

3.2.2 Dosagens de compostos fenólicos e β -glucanas

A determinação de compostos fenólicos por análise colorimétrica foi realizada em triplicata segundo o método descrito por Scalbert, Monties, Janin (1989) de acordo com as modificações realizadas por Ramirez-Anguiano et al. (2007), e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG)/grama de amostra em base seca. A determinação de glucanas foi realizada em duplicata, por hidrólises enzimáticas e químicas, realizadas com por kit comercial Mushroom and yeast beta-glucan - Megazyme®.

3.3 Animais

Ratos Wistar (oito machos pesando entre 250 e 300 g e vinte e quatro fêmeas pesando entre 180 a 200 g), foram adquiridos com seus respectivos atestados de saúde, do Biotério da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, Brasil (ANEXO B). Os animais foram ambientados no Biotério de Experimentação Animal do Lapetox, em temperatura e ciclos claro/escuro, controlados automaticamente, a 25 ± 3 °C e 12 h, e alojados, em gaiolas acrílicas e forração de maravalha, no Sistema de Controle Microambiental da Marca Alesco® (Figura 3), e de acordo com os critérios de bem-estar animal. Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Figura 3 - Isoladores micro ambientais Alesco® para alojamento dos animais.

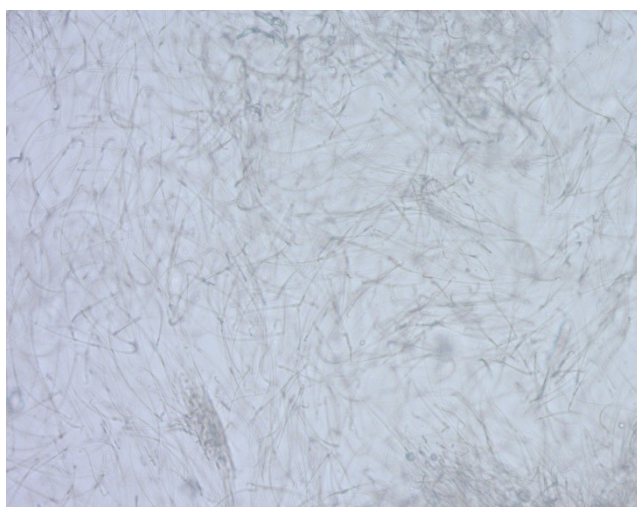


Fonte: Elaboração própria.

3.4 Acasalamento e Prenhez

Para o acasalamento os animais foram alojados em número de três, 01 macho com 02 fêmeas, por um período noturno de 12 horas. Por meio de observações microscópicas (Microscópio Biológico, Modelo Axio Lab.A1, ZEISS®), a indicativa do primeiro dia da prenhez, conforme ilustra a Figura 4, foi presença de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal (GERENUTTI; DEL FIOL; GROPPPO, 2006).

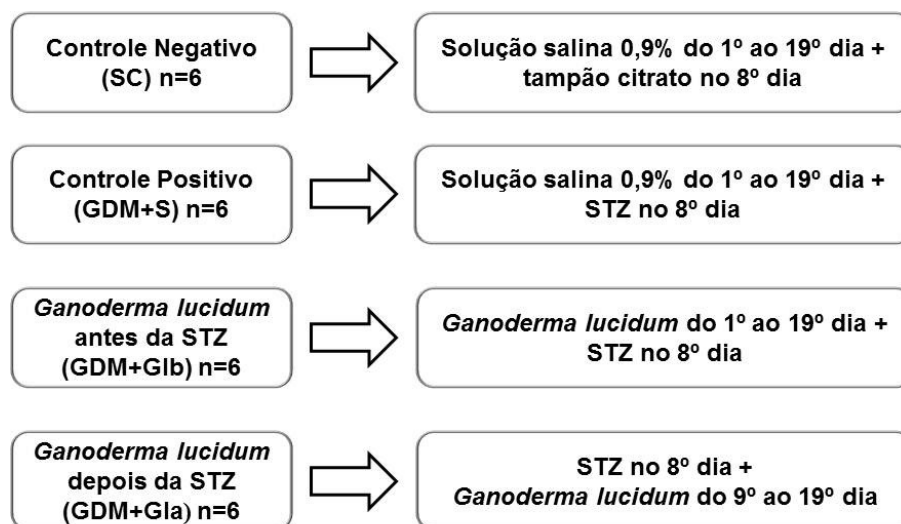
Figura 4 - Presença de espermatozoides no lavado vaginal de rata Wistar como indicativo do primeiro dia de gestação.



Fonte: Elaboração própria (esfregaço vaginal, aumento 5x).

Após a confirmação da prenhez, foi realizada uma divisão randomizada dos grupos (Figura 5), onde as ratas foram divididas individualmente em 04 grupos de seis animais.

Figura 5 - Divisão dos grupos após confirmação da prenhez.



Fonte: Elaboração própria.

3.5 Escolha da dose e exposição ao cogumelo

A dose definida em 100 mg/kg/dia, em dose diária única, para este trabalho foi baseada em estudos anteriores de doses com outros cogumelos culinário-medicinais empregados no Lapetox-Uniso (FRIZO et al., 2014a; GROTTTO et al., 2016) e tendo por base a dose diária recomendada do *Ganoderma lucidum* como suplemento alimentar no tratamento do diabetes pela *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (COMMISSION, 2010).

O cogumelo foi administrado às ratas prenhes em dois momentos: no grupo GDM+Glb o *Ganoderma lucidum* foi administrado do 1º ao 19º dia de prenhez e no grupo GDM+Gla o *Ganoderma lucidum* foi administrado a partir do 9º até o 19º dia de prenhez. Em todos os momentos o cogumelo foi administrado por via oral (gavagem) e a STZ foi administrada no 8º dia de prenhez.

3.6 Indução e Acompanhamento do Diabetes Mellitus Gestacional (GDM-STZ)

Para a indução do Diabetes Mellitus, os animais receberam, por via intravenosa (veia caudal) conforme mostra a Figura 6, injeção 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) na dose de 40 mg/kg. A dose e a via de administração da estreptozotocina foram escolhidas com base em nossos estudos de revisão (MASCHIO et al., 2017), sendo considerada a via intravenosa de ação mais prolongada e efetiva sob as células beta pancreáticas.

Figura 6 - Indução do diabetes pela administração de STZ na veia caudal.



Fonte: Elaboração própria.

Após 48 horas da administração da STZ, o sangue periférico do pavilhão auricular foi colhido para dosagem de glicose (Monitor de Glicemia FreeStyle Lite, Abbott) (Figura 7). Animais com glicemia acima de 120 mg/dL foram considerados diabéticos. O peso dos animais foi acompanhado diariamente em balança digital eletrônica (Sf-400).

Figura 7 - Aferição da glicemia após 48h da indução do GDM-STZ via punção de vaso periférico do pavilhão auricular.



Fonte: Elaboração própria.

3.6.1 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Para o acompanhamento da GDM-STZ foi empregado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), realizado no 17º dia de prenhez, segundo protocolo de De Mello e colaboradores (2001). Após jejum de 6 horas, uma solução de dextrose (2 g/kg de peso corporal) foi administrada por gavagem; o sangue periférico do pavilhão auricular foi colhido para dosagem de glicose (Monitor de Glicemia FreeStyle Lite, Abbott) em 0, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos (Figura 8).

Figura 8 - Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG) com monitoramento de 2 horas das ratas GDM-STZ.



Fonte: Elaboração própria.

3.7 Procedimento de Cesárea

Para avaliação materna (item 3.8), avaliação da capacidade reprodutiva (item 3.9) e avaliação do desenvolvimento embrionário e placentário (item 3.10), foram realizados os procedimentos de cesárea. No vigésimo dia de prenhez, as ratas 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 IP. O procedimento de cesárea foi realizado com uma incisão longitudinal na linha alba para exposição do útero e dos ovários.

3.8 Avaliação Materna

O sangue materno foi coletado por punção venosa hepática (em seringa previamente heparinizada) e transferido para dois tubos: (tubo A) contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi utilizado para avaliação hematológica e estado redox; (tubo B) sem o anticoagulante e com gel separador foi utilizado para avaliações bioquímicas.

3.8.1 Análise Hematológica Materna

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

3.8.2 Análises Bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos analisados com o auxílio do equipamento automático Cobas C111, Roche® foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, creatina quinase (CK), creatinina, colesterol total, glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL-col), triglicérides e ureia. A dosagem plasmática de insulina foi realizada por teste Elisa (Tecan

M200 pro), de fase sólida, baseado no princípio Sanduíche, utilizando-se kit comercial específico para ratos, Rat/Mouse Insulin Elisa Kit - Merck®.

3.8.3 Avaliação de Estresse oxidativo

Para a análise de estresse oxidativo foram analisadas as atividades das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), a concentração de glutathione reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA).

A determinação da 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 (Sorvall® ST 16R) 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. A leitura foi feita em seguida no espectrofotômetro (PerkinElmer®, Lambda 35) com comprimento de onda de 412 nm. Uma curva de calibração com concentrações pré-definidas de GSH (0,005; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1 µmol) foi utilizada para o cálculo da concentração. Os resultados foram expressos em µmol/L de sangue total.

A atividade da enzima antioxidante GPx foi determinada em sangue total. O sangue foi diluído 40 vezes em tampão fosfato de potássio com EDTA, pH 7,0. Após, 20 µL da amostra diluída foi acrescentado em 880 µL de uma solução contendo glutathione reduzida, glutathione reductase, 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 hemoglobina (Hb) expressos em g/L.

A atividade da enzima catalase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS (PerkinElmer®, Lambda 35) utilizando método de Aebi (1984). O método baseia-se na decomposição do H_2O_2 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 μ L de sangue diluído foi misturada a 1910 μ L de mesmo tampão fosfato de potássio, e 70 μ L de H_2O_2 foram adicionados, dando início à reação. As mudanças na absorbância 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) como MDA são importantes para avaliação da peroxidação lipídica (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Sendo assim, alíquotas de plasma (150 μ L) foram misturados com 50 μ L de NaOH e 100 μ L de Milli-Q Water™ (Millipore, Billerica, MA, EUA). A mistura foi incubada durante 30 min a 60 °C com agitação. Então, 500 μ L de H_3PO_4 6%, 500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% e 100 μ L 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 uma curva de calibração (predefinida concentrações de 0,57, 1,43, 2,86 e 5,71 μ M) para calcular a concentração de TBARS no material.

3.8.4 Avaliação Histológica Materna

Amostras de fígado, rim e pâncreas foram coletadas e processadas de forma rotineira para avaliação histopatológica. A fixação foi feita em formalina tamponada por 48 horas e, a seguir, as amostras foram lavadas em *overnight* em água corrente. Os órgãos foram então armazenados em álcool 70%. Posteriormente, os tecidos foram processados no Processador Automático de Tecidos PT12 (O Patologista®), de forma rotineira. A seguir as peças foram emblocadas com parafina histológica e armazenadas até serem enviadas para processamento no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia

Veterinária da FMVZ - UNESP, do Departamento de Clínica Veterinária em Botucatu - SP, pelo Prof. Dr. Alexandre Hataka. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo semi-automático (Leica RM2155) com quatro micrômetros de espessura, colhidos em lâminas histológicas e corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina, os cortes foram cobertos com resina histológica e lamínula de vidro (TOLOSA et al., 2003). As lâminas dos fígados, pâncreas e rins foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), oriundas de cada animal, foram analisadas às cegas.

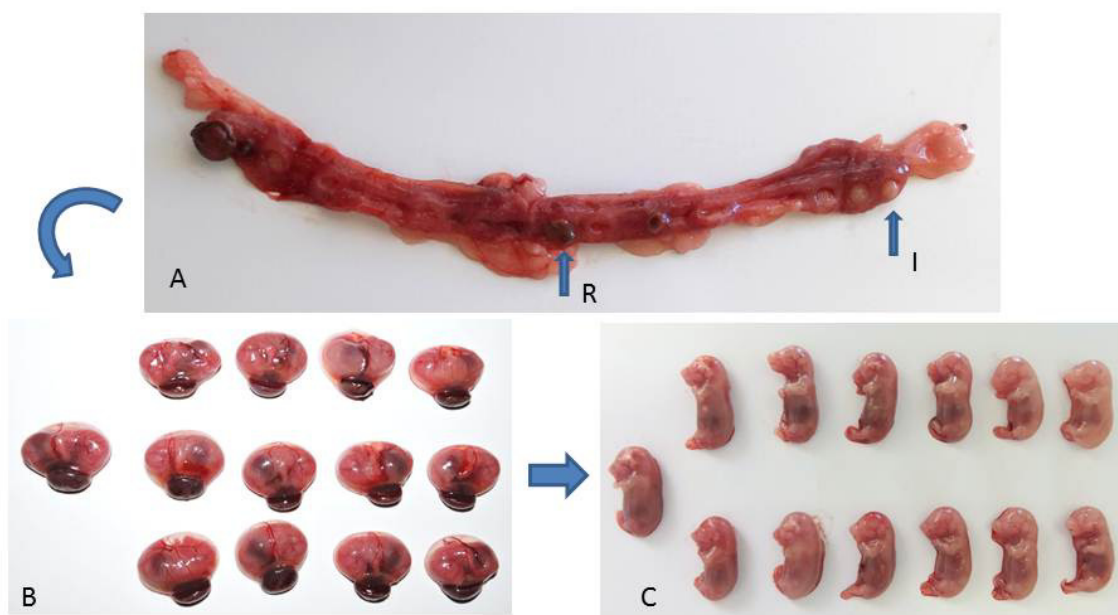
A análise da lesão endócrina pancreática foi feita de forma quantitativa onde foram contadas todas as ilhotas de Langerhans presentes nos cortes histológicos de cada animal. Os dados foram anotados em planilhas para posterior análise.

Os rins e fígados maternos foram analisados histopatologicamente de forma qualitativa e descritiva em toda extensão dos cortes para visualização de alterações degenerativas e/ou necróticas para cada amostra.

3.9 Avaliação da Capacidade Reprodutiva

As fêmeas foram sacrificadas e o útero e os ovários foram retirados. Em seguida o útero foi inspecionado quanto ao número de fetos, de implantações e reabsorções visíveis conforme ilustra a Figura 9, para avaliação das perdas pós-implantação do embrião.

Figura 9 -Procedimento metodológico utilizado para a avaliação da capacidade reprodutiva de ratas.



A: Útero após retirada dos sacos gestacionais. B: Fetos dentro do saco gestacional. C: Fetos depois da retirada dos sacos gestacionais. Nota: R: Reabsorção. I: Implantação da placenta.

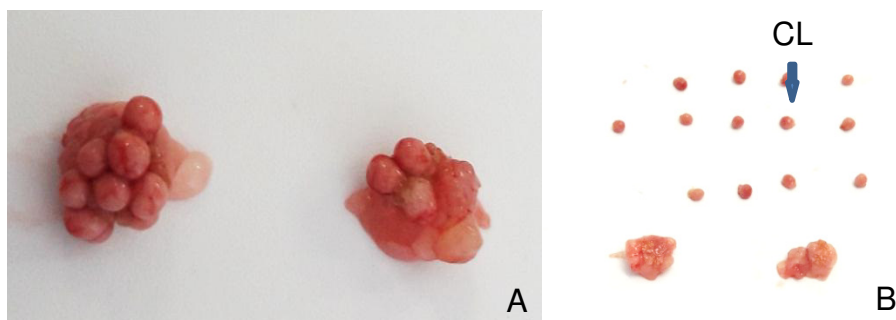
Fonte: Elaboração própria.

Para avaliação das perdas pós-implantação (GERENUTTI et al., 2014) foi empregada a equação:

$$PerdasPós - implantação = \frac{n^{\circ}deimplantações - n^{\circ}defetosvivos}{n^{\circ}deimplantações} \times 100$$

A Figura 10 ilustra o procedimento empregado para a avaliação de perdas pré-implantação do embrião, onde os ovários após pesados foram seccionados para retirada e contagem do número de corpos lúteos.

Figura 10 - Ovários com corpos lúteos e corpos lúteos retirados dos ovários.



Nota: A: Ovários com presença de corpos lúteos. B: Ovários seccionados e contagem de corpos lúteos. CL: Corpo lúteo.

Fonte: Elaboração própria.

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

$$PerdasPré - implantação = \frac{n^{\circ}de\text{corpos lúteos} - n^{\circ}de\text{implantações}}{n^{\circ}de\text{corpos lúteos}} \times 100$$

3.10 Desenvolvimento embriofetal e análise placentária

3.10.1 Coleta e processamento de líquido amniótico

O líquido amniótico foi coletado dos sacos gestacionais e transferido para dois tubos tipo *ependorf* para avaliação bioquímica e análise de insulina, procedimento ilustrado na Figura 11. O processamento das amostras foi feito através de uma adaptação do método utilizado por Zogno et al. (2004). No momento da análise, a amostra de líquido amniótico foi descongelada e centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm e 22°C (Sorvall® ST 16), o sobrenadante foi utilizado para realização das análises de ALT, AST, glicose, CK e lipase (equipamento Cobas C111, Roche®). A dosagem de insulina foi realizada por teste Elisa (Tecan M200 pro), de fase sólida, baseado no princípio Sanduíche com kit comercial específico para ratos, Rat/Mouse Insulin Elisa Kit - Merck®.

Figura 11 - Procedimento para a coleta de líquido amniótico do saco gestacional.

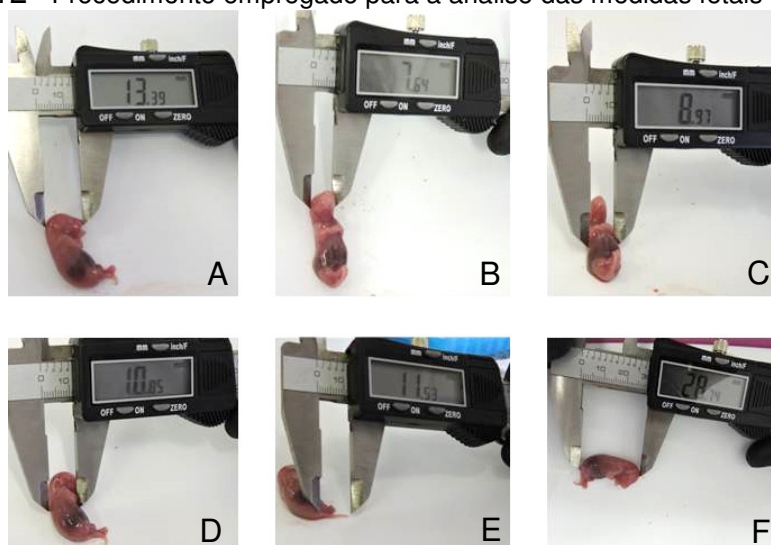


Fonte: Elaboração própria.

3.10.2 Avaliação morfológica fetal

Após a abertura do saco embrionário os fetos foram separados das placentas, pesados em balança (Ohaus®-AS200S), e analisados através de medidas morfométricas externas ilustradas na Figura 12, onde foram realizadas as medidas ântero-posterior do crânio, látero-lateral do crânio, ântero-posterior do tórax, látero-lateral do tórax, crânio-caudal e cauda.

Figura 12 - Procedimento empregado para a análise das medidas fetais externas.



Nota: A: Ântero-posterior do crânio. B: Látero-lateral do crânio. C: Látero-lateral do tórax. D: Ântero-posterior do tórax. E: cauda. F: Crânio-caudal.

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, os fetos foram anestesiados e eutanasiados com halotano (saturação de cuba) e divididos em dois grupos para: análise histológica visceral e análise óssea.

Análise histológica visceral - os fetos foram fixados em formol tamponado, armazenados em álcool 70% e posteriormente, o cérebro e os

rins foram retirados e processados, conforme o protocolo descrito no item 3.9. Foram colhidas amostras de cérebro e rins direito e esquerdo. Os rins foram cortados longitudinalmente, enquanto que os cérebros transversalmente. Todas as lâminas histopatológicas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina oriundas de cada animal foram analisadas às cegas. Os cortes transversais dos cérebros foram feitos no terço final do órgão na região média do hipocampo. Foram realizadas análises quantitativas do órgão que consistiram nas medidas do hipocampo e do córtex cerebral de cada feto. Os dados foram anotados em planilhas para posterior análise. Os cortes longitudinais de ambos os rins foram analisados de forma quantitativa, que consistiu da contagem dos glomérulos presentes em cada órgão. Os dados foram anotados em planilhas para posterior análise.

Análise óssea - Para o estudo ósseo foram realizados os procedimentos de evisceração, diafanização e coloração, segundo Frizo (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 deposição de cálcio e cora os ossos de vermelho e a cartilagem em azul. A Figura 13 ilustra como o 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 13- Feto diafanizado e corado com Alizarin red S plus e Alcian blue



Fonte: Elaboração própria.

3.10.3 Processamento da placenta

Após a abertura do saco embrionário as placentas foram retiradas, pesadas em balança (Ohaus®-AS200S) e divididas em: (1) avaliação morfométrica; (2) avaliação bioquímica e de estado redox.

A análise histológica das placentas foi realizada após as mesmas terem sido fixadas e processadas, conforme o protocolo descrito no item 3.9. A análise foi feita de forma quantitativa e consistiram das medidas em micrometros da largura e da espessura da placenta de cada feto e foram realizadas com auxílio de microscópio acoplado a câmara digital (Carl zeiss-AX10, imager A1, AxioCam MRc-60 N-C 2/3" 0,63x) através do programa de análise de imagens AxioVision Rel. 4,6. Os dados foram anotados em planilhas para posterior análise.

Para o estresse oxidativo e análises bioquímica, as placentas foram armazenadas em biofreezer a -80 °C (REVCO® ULT-1386-3-D) até o momento das análises.

Para avaliação do estado redox, um pool com 250 mg de placentas de cada rata gestante foi sonificado com 5 mL de KCl 1,15% com auxílio de processador ultrassônico (Sonics® VCX 130 PB) por dois ciclos de 30 segundos com 35% de amplificação e posteriormente processadas de acordo com as análises específicas seguindo todos os procedimentos de leitura UV/visível descritos no item 3.8.3.

Para análise de GSH, 250 μL de sobrenadante do homogenato de placentas (precipitado com TCA 30% e centrifugado) e 100 μL de DTNB 10 mM foram adicionados em 900 μL de tampão fosfato. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/grama}$ de tecido. A atividade da enzima antioxidante GPx foi determinada no homogenato de placenta, baseada na oxidação do NADPH a 25°C. Na análise da placenta, 20 μL do homogenato foi acrescentado em 880 μL de uma solução contendo glutathiona reduzida, glutathiona redutase, NADPH, azida sódica e 100 μL de H_2O_2 . Os dados foram expressos em $\mu\text{mol NADPH/min/mL}$.

A avaliação a atividade da catalase, 20 μL do homogenato foi adicionado em 1910 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM e 70 μL de H_2O_2 , dando início à reação, e as mudanças na absorbância foram monitoradas por três minutos, sendo os resultados foram expressos em $\kappa/\text{min.g}$ de tecido. Para análise de MDA das placentas, 250 μL de homogenato foram misturadas com 1500 μL de H_3PO_4 6%, 500 μL de TBA 0,8% e 100 μL de SDS a 10%, e foram incubadas durante 45 min a 90 °C, após as leituras os resultados forma expressos em $\mu\text{mol/grama}$ de tecido.

No momento das análises bioquímicas, o mesmo procedimento de sonicação descrito acima foi realizado e a solução formada foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm e 22 °C e o sobrenadante coletado para posterior análise de ALT, AST e CK (equipamento Cobas C111, Roche®).

3.11 Análise estatística

Para análise dos resultados foi utilizado o nível de significância entre 1% e 5%. O teste de Bartlet 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).

4 RESULTADOS

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

4.1 Determinação de β -glucanas e Compostos Fenólicos

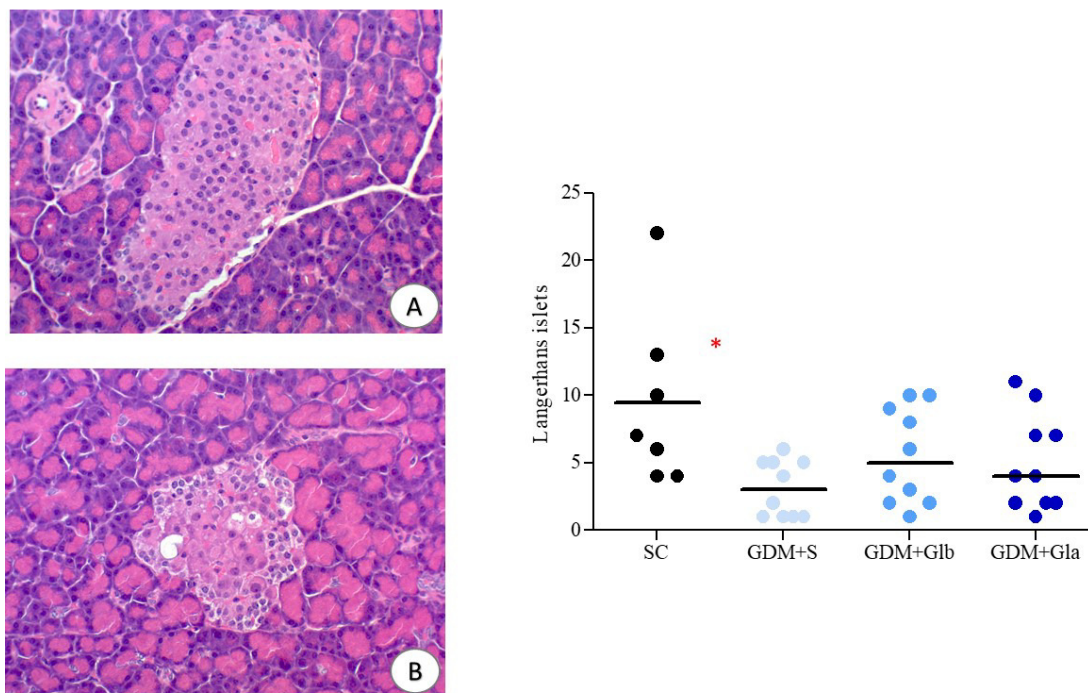
Foram encontradas na amostra do cogumelo *Ganoderma lucidum* 30g de β -glucanas por 100g de cogumelo seco e 1,8mg EAG/g de amostra seca de compostos fenólicos.

4.2 Acompanhamento do GDM-STZ

4.2.1 Avaliação histológica do pâncreas materno e perfil glicêmico no GDM-STZ

A Figura 14 mostra a mediana e a dispersão do número de ilhotas de Langerhans, por corte histológico, de cada fêmea. Apenas o grupo DGM+SC apresentou redução do número de ilhotas pancreáticas em relação ao grupo SC ($F=3,603$, $P=0,0235$).

Figura 14 - Quantitative analysis of the islets of Langerhans in GDM-STZ rats.



Nota: Female Group Langerhans islet SC, B: Group GDM + SC female langerhans islet. HE. 40X

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

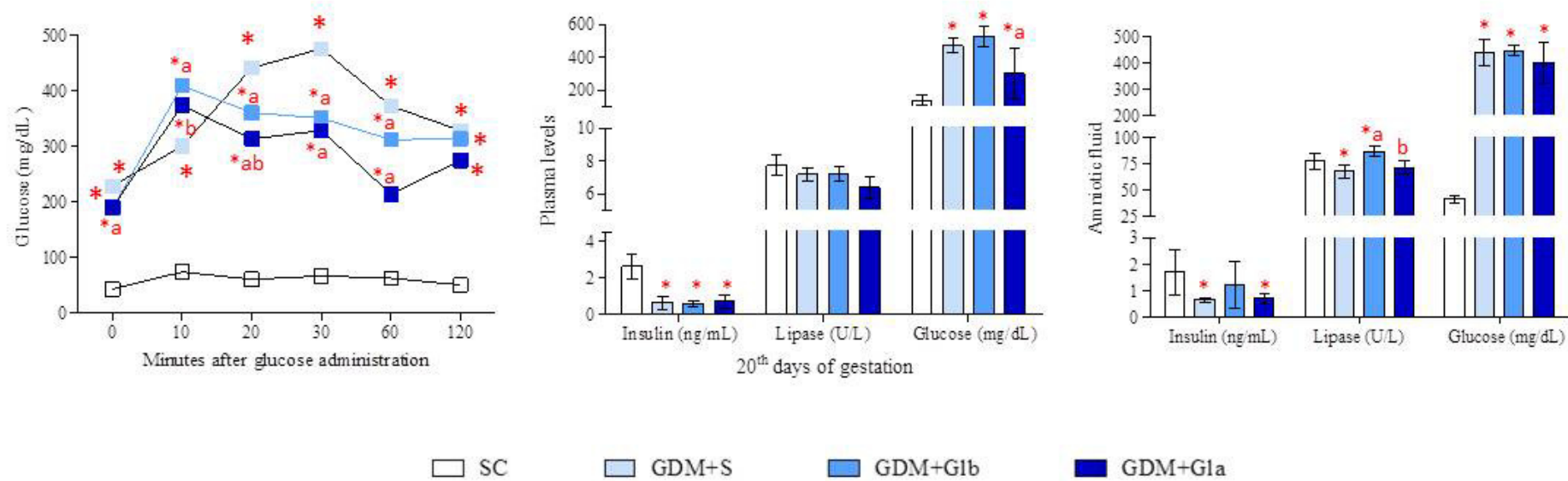
A Figura 15 ilustra a avaliação da função pancreática no GDM-STZ, considerando-se a curva glicêmica materna, os níveis de insulina, da enzima hepática lipase e de glicose materna e fetais. A curva glicêmica do TOTG realizada no 17º dia gestação indicou que os três grupos GDM apresentaram taxas glicêmicas elevadas em todos os tempos aferidos. Houve uma diferença entre os grupos diabéticos em 10', onde o grupo GDM+Glb apresentou pico glicêmico maior que os outros 2 grupos ($F=19,49$; $P<0,001$). Nos tempos 20', 30' e 60', os grupos expostos ao *Ganoderma lucidum* mostraram níveis glicêmicos inferiores aos do DGM+S.

Os grupos GDM apresentam diminuição dos níveis de insulina no soro materno ($F=28,09$; $P<0,0001$) e aumento da glicose plasmática ($F=14,21$; $P<0,0001$), apesar disso o grupo GDM+Gla apresentou redução da glicemia quando comparado ao GDM+S. O líquido amniótico manteve o mesmo padrão

glicêmico materno em relação à insulina ($F=3,005$; $P=0,0725$) e à glicemia ($F=65,62$; $P<0,0001$).

A lipase no líquido amniótico do grupo GDM+Glb foi maior quando comparada aos demais grupos e o grupo GDM+S apresentou nível menor de lipase em relação ao grupo SC ($F=4,232$; $P=0,0252$).

Figure 15 - The evolution of GDM-STZ.



SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). *p<0.05 in comparison to SCgroup, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

4.2.2 Avaliação hematológica, bioquímica e histológica de rim e fígado de ratas GDM-STZ.

A Tabela 1 mostra os valores hematológicos de ratas GDM-STZ. Os grupos GDM+S e GDM+Glb mostraram aumento do hematócrito e do número de plaquetas em relação ao grupo SC, no entanto o grupo GDM+Gla apresentou diminuição de hematócrito e plaquetas quando comparado aos outros grupos diabéticos ($F=7,759$, $P=0,0032$) e ($F= 2,307$, $P=0,0005$).

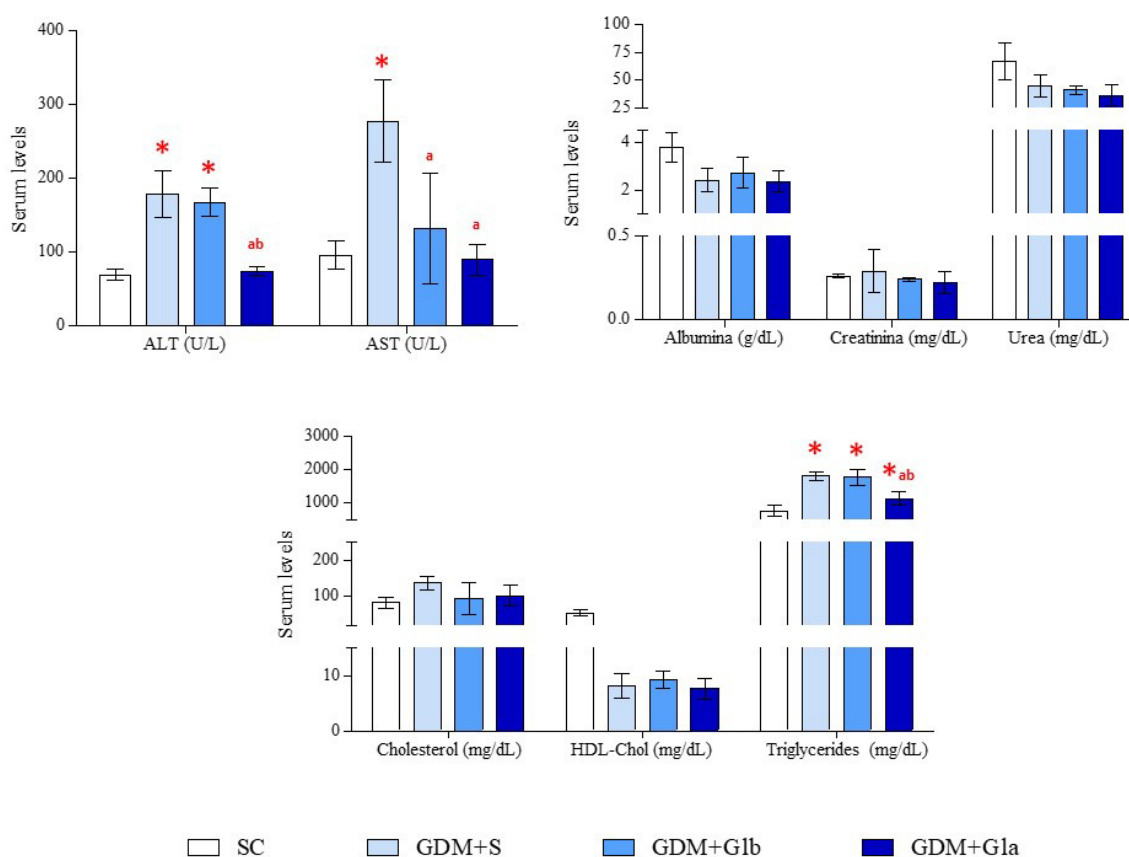
Tabela 1 -Hematological parameters of rats GDM-STZ treated with *Ganoderma lucidum*.

Groups	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	Platelet ($10^3/\text{UI}$)
SC	11,55 $\pm$ 0,75	36,52 $\pm$ 2,01	4,59 $\pm$ 0,85	5,98 $\pm$ 0,44	296,00 $\pm$ 67,88
GDM+S	11,82 $\pm$ 1,61	41,33 $\pm$ 1,01*	7,71 $\pm$ 1,99	6,08 $\pm$ 0,93	445,00 $\pm$ 26,00*
GDM+Glb	12,72 $\pm$ 0,92	41,15 $\pm$ 2,87*	6,155 $\pm$ 2,30	6,51 $\pm$ 0,62	549,00 $\pm$ 70,71*
GDM+Gla	11,28 $\pm$ 0,21	36,33 $\pm$ 1,60 ^{ab}	6,18 $\pm$ 11,34	5,79 $\pm$ 0,35	212,75 $\pm$ 51,62 ^{ab}
	($F= 1,941$, $P=0,1637$)	($F=7,759$, $P=0,0032$)	($F= 1,774$, $P=0,210$)	($F= 1,257$, $P=0,3226$)	($F= 2,307$, $P=0,0005$)

SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). WBC(white blood cel), RBC (red blood cel). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). * $p<0.05$ in comparison to SCgroup, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

As avaliações hepáticas e renais de ratas GMD-STZ foram realizadas correlacionando-se as análises bioquímicas e histológicas. A Figura 16, mostra o resultado do perfil bioquímico no GDM-STZ do soro materno, onde observa-se que a ALT encontra-se aumentada no soro nos grupos GDM+S e GDM+Glb em relação aos grupos SC e GDM+Gla ($F=30,22$; $P<0,0001$); a AST no grupo GDM+S foi maior em relação ao grupo SC e aos grupos GDM expostos ao *Ganoderma lucidum* ($F=6,884$; $P=0,0051$); as taxas de triglicérides nos grupos GDM apresentaram aumento em relação ao grupo SC ($F=2,588$; $P=0,0025$) apesar disso, o grupo GDM+Gla apresentou valor menor quando comparado aos demais diabéticos.

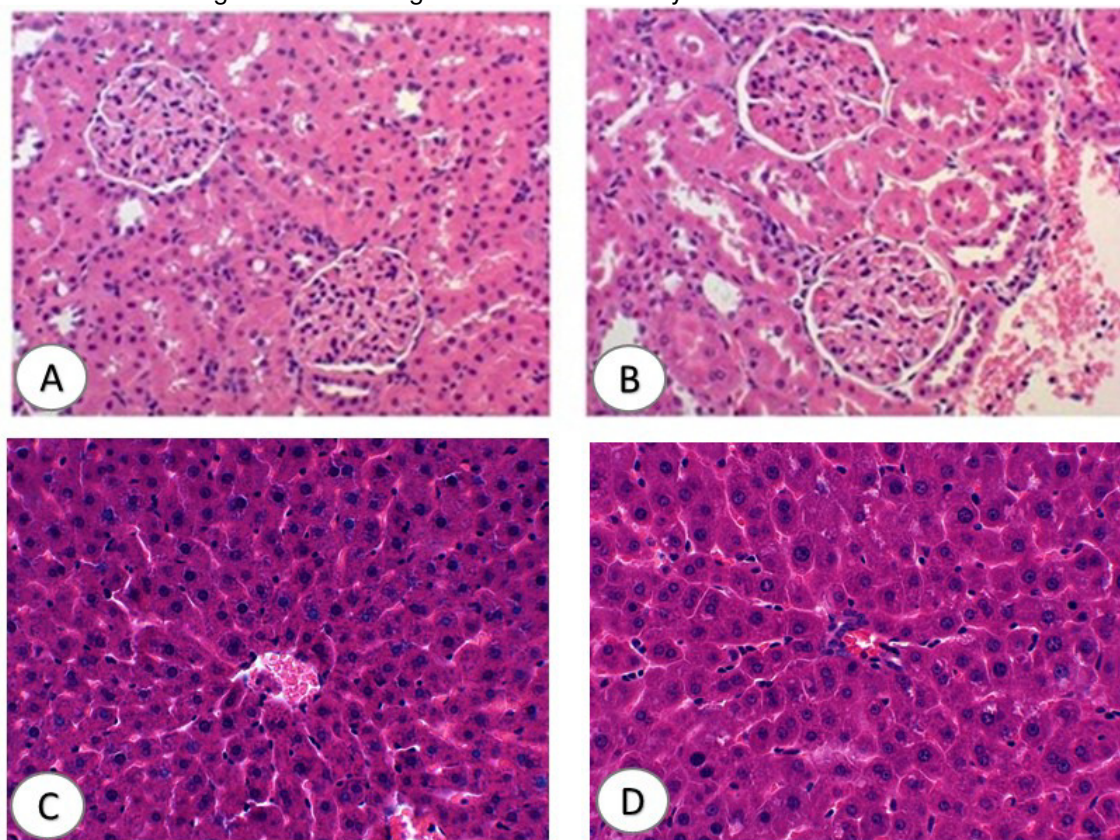
Figura 16 - Biochemical in GDM-STZ of maternal serum.



SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). AST (aminotransferase de aspartate), ALT (aminotransferase de alanine), HDL-Chol (high-density lipoproteins). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). *p < 0.05 in comparison to SC group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

A avaliação histológica dos cortes de rim e fígado maternos dos grupos SC e dos grupos GDM não apresentou diferença relacionada à morfologia, não havendo diferença entre os quatro grupos. A figura 17 ilustra os cortes histológicos dos grupos controle e diabético.

Figura 17 - Histological sections of kidneys and maternal livers.



Note: A: maternal kidney SC, B: maternal kidney GDM+SC, C: maternal liver SC, D: maternal liver GDM+SC, HE 40x.

4.3 Avaliação da Capacidade Reprodutiva

As alterações na capacidade reprodutiva dos animais GDM-STZ estão apresentadas na Tabela 2, onde se observa menor peso de útero e de ovários no grupo GDM+S em relação ao grupo SC; as maiores porcentagens de perdas pós-implantação foram observadas nos três grupos GDM em relação ao grupo SC. Não foram observadas perdas pré-implantação (dado não apresentado).

Tabela 2 – Reproductive Capacity of GDM-STZ rat treated with *Ganoderma lucidum*.

Groups	Uterus weight (g)	Ovary weight (g)	Offspring vitality	Post-implantation loss (%)
SC	44,48 ± 13,83	0,142 ± 0,015	9,75 ± 1,83	4,6
GDM+S	35,40 ± 12,49*	0,112 ± 0,019*	8,16 ± 1,53	16*
GDM+Glb	43,18 ± 2,95	0,117 ± 0,017	11,0 ± 1,58	13,8*
GDM+Gla	48,52 ± 3,89	0,104 ± 0,020	11,83 ± 0,69	14,1*
	(F=1,159, P=03539)	(F=8,561, P<0,0001)	(F=1,608, P=0, 0,2269)	(P=0,0367)

SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean ± SD (n = 6). *p<0.05 in comparison to SC group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

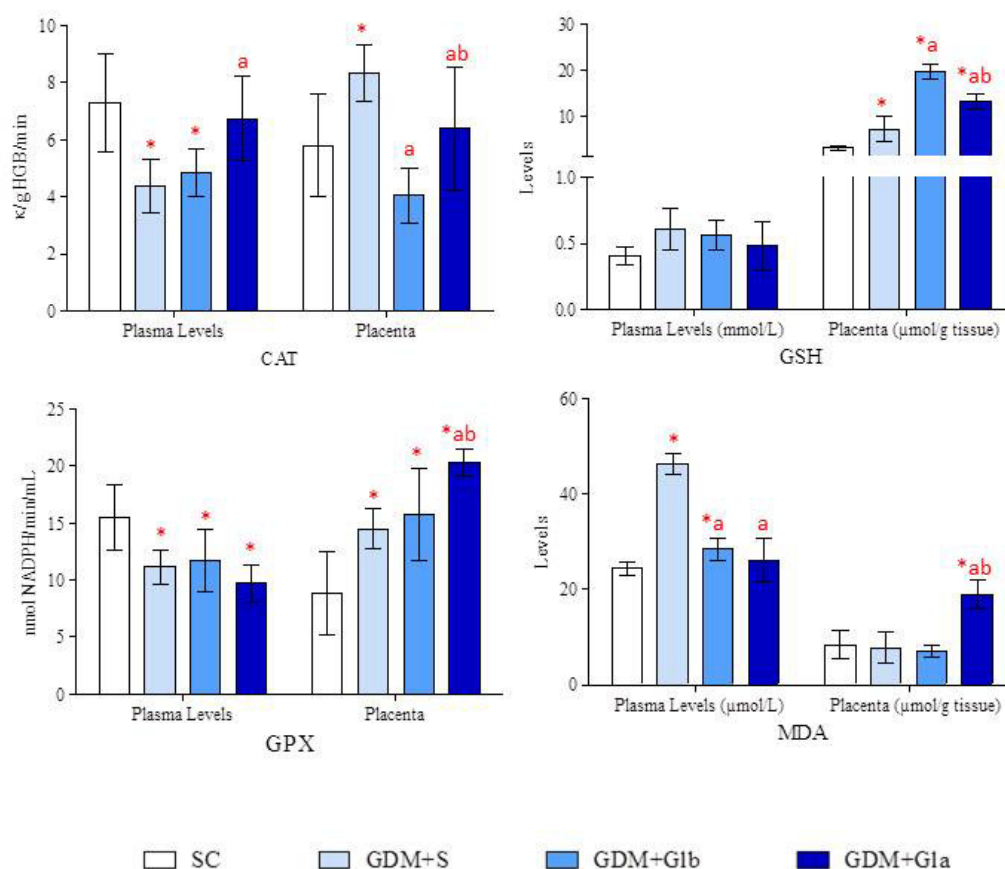
4.4 Avaliação do estado redox no GMD-STZ

A avaliação do estado redox no GDM-STZ foi realizada com a comparação entre os biomarcadores de estresse oxidativo do sangue materno e da placenta. A Figura 19 exhibe os valores destes biomarcadores onde observa-se que catalase no plasma está diminuída nos grupos GDM+S e GDM+Glb em relação aos grupos SC e GDM+Gla ($F=2,733$; $P=0,0901$), porém na placenta o grupo GDM+S mostrou aumento em relação ao grupo SC e aos grupos GDM. Na placenta a concentração de GSH foi maior nos grupos GDM em relação ao grupo SC ($F=53,33$; $P<0,0001$) sendo esse aumento maior no grupo GDM+Glb em relação aos outros do grupo GDM.

Em relação à GPx, os grupos GDM mostraram diminuição no plasma e aumento na placenta, quando comparados ao grupo SC ($F=16,54$; $P=<0,0001$).

No plasma o grupo GDM+S mostrou MDA mais elevado quando comparado aos grupos SC e aos grupos expostos ao *Ganoderma lucidum* ($F=14,15$; $P=0,0004$), na placenta apenas o grupo GDM+Gla mostrou aumento de MDA em relação aos demais grupos ($F=20,24$; $P<0,0001$).

Figura 18 - Oxidative stress of maternal plasma and placenta of pregnant rats GDM-STZ treated with *Ganoderma lucidum*.



SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), and glutathione peroxidase reduction (GPX), malondialdehyde (MDA). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). *p<0.05 in comparison to SC group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb, group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

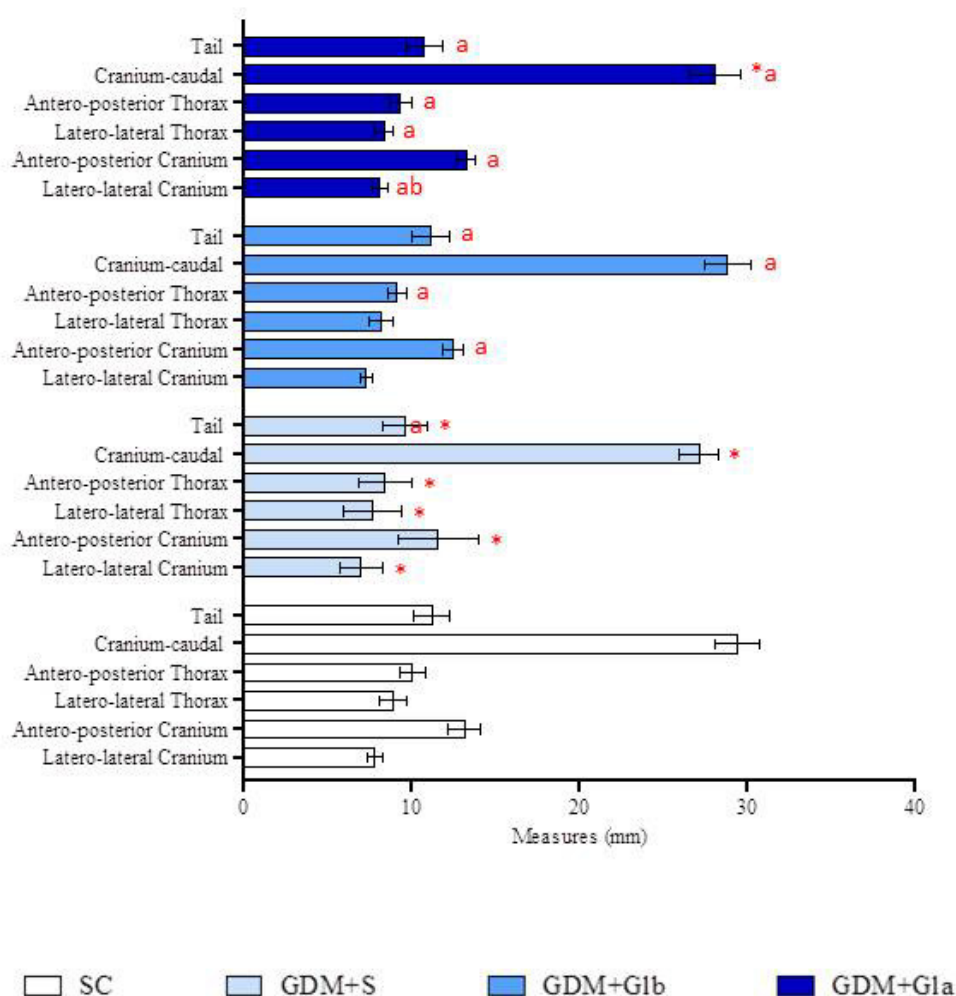
4.5 Avaliação do desenvolvimento intrauterino de ratos expostos à estreptozotocina

A avaliação intrauterina de ratos expostos a STZ no período gestacional compreende as análises morfológicas dos fetos, bioquímica e histologia da placenta e bioquímica do líquido amniótico.

A Figura 19 mostra a análise morfométrica dos fetos, onde observa-se que grupo GDM+S apresentou diminuição em todos os parâmetros quando

comparado aos grupos SC, GDM+Glb e GDM+Gla. Entre os grupos expostos ao *Ganoderma lucidum*, o GDM+Gla apresentou maior medida látero-lateral do crânio quando comparado ao GDM+Glb ($F=24,73; P<0,001$).

Figura 19 - Fetal measurements.



SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean $\pm$ SD (SC n = 57; GDM+S n = 47; GDM+Glb n = 41; GDM+Gla n = 70). * $p<0.05$ in comparison to SCgroup, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group, one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

A tabela 3 mostra as anormalidades fetais registradas em animais diafanizados levando-se em conta a idade gestacional. Observa-se ossificação reduzida em membros nos grupos GDM+STZ quando comparados ao grupo SC, entretanto o grupo GDM+Gla apresentou melhor resposta à essa

ossificação quando comparado aos demais grupos diabéticos. O grupo GDM+Glb apresentou ossificação incompleta de crânio quando comparado aos demais grupos.

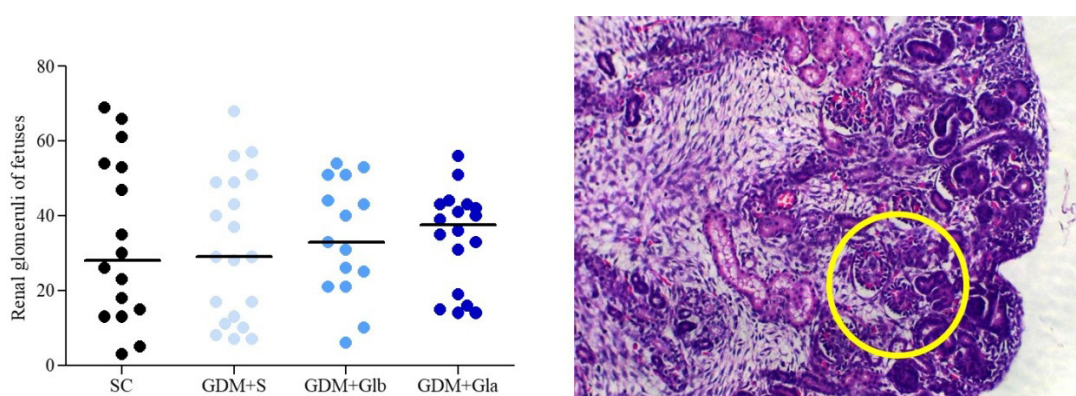
Tabela 3 - The incidence of morphological fetal anomalies of fetus of GMD-STZ treated with *Ganoderma lucidum*.

	SC (n=13)	GDM+S (n=15)	GDM+Glb (n=13)	GDM+Gla (n=23)
Incomplete ossification of skull	0	0	15.4 ^a	0
Hindleg agenesis	0	0	0	0
Incomplete ossification of sternebra	100	100	100	100
Lack of sternum	0	0	0	0
Reduced ossification of forelimbs and hind limbs	0	73.3 [*]	53.8 ^a	4.3 ^{ab}
Incomplete skeletal ossification	0	0	7.7	4.3
Ossificação incompleta ossos pelvis	30.7	40	23	30.4

SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as percentage (n: number of fetuses examined) ^{*}p<0.05 in comparison to SC group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group, Chi-square Test.

A Figura 20 mostra a mediana e a dispersão do número de glomérulos de ambos os rins dos fetos, observa-se que não houve diferença entre os grupos (F= 0,092 e P< 0,05).

Figura 20 - Fetal Glomerulus Count.

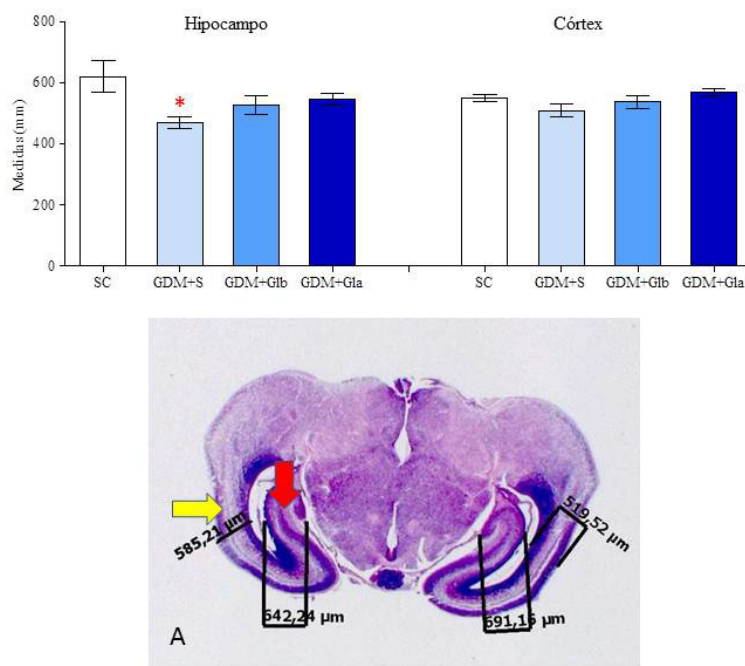


Note: Histologic cut image of the kidney fetus. (yellow circle indicating a glomerulus). HE. 40X

SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as median (n = 16). p>0.05 in comparison to SC group, group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

A Figura 21 mostra os valores das medidas de hipocampo e córtex do encéfalo dos fetos. Apenas o grupo GDM+SC apresentou medidas inferiores do hipocampo em relação ao grupo SC ($F= 3,80$ e $P< 0,05$). Em relação ao córtex não foram evidenciadas diferenças significantes ($F= 2,28$ e $P< 0,05$).

Figura 21 - Measurement of hippocampus and fetal cortex.



Note: Histological cut image of fetal encephalon. (yellow arrow indicates the cortex and red arrow the hippocampus). HE. 40X

SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 8). * $p<0.05$ in comparison to SC group, group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

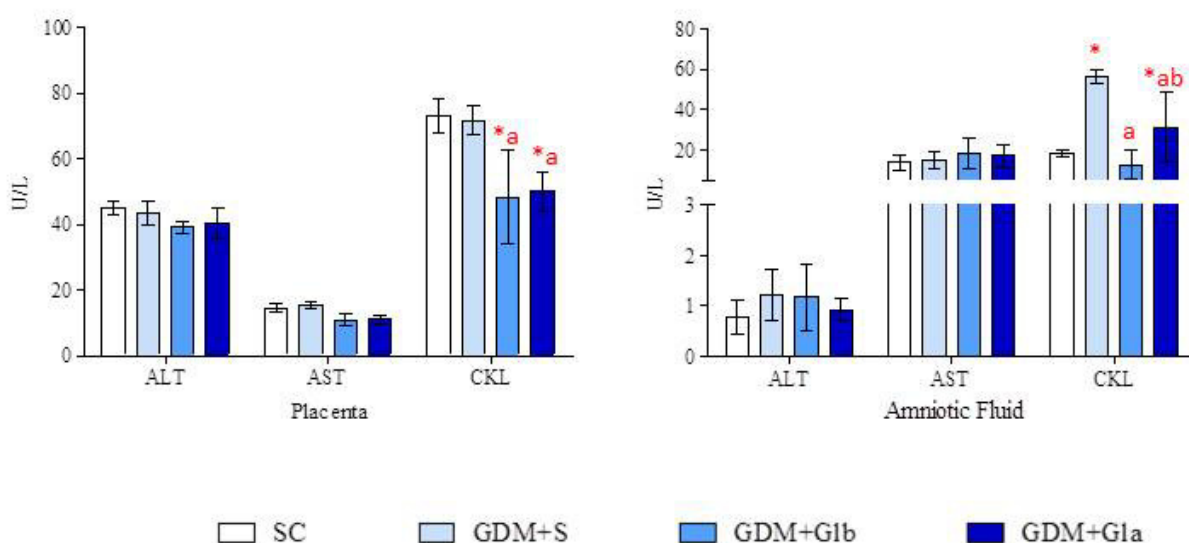
4.6 Avaliação placentária e do líquido amniótico

Para análise da função placentária foram empregadas análises bioquímicas da placenta e do líquido amniótico e a avaliação morfológica da placenta.

A Figura 22 mostra os resultados do perfil bioquímico da placenta e do líquido amniótico indicando alterações apenas nos níveis de CK, onde a

placenta dos grupos GDM expostos ao *Ganoderma lucidum* mostraram resultados de CK mais baixos quando comparados aos grupos SC e GDM+S ($F=11,28$; $P=0,0006$); e a CK do líquido amniótico mostrou aumento nos grupos GDM+S e GDM+Gla em relação aos grupos SC e GDM+Glb ($F=1,572$; $P=0,2437$), porém esse aumento foi menor no grupo GDM+Glb.

Figura 22 -Biochemical in GDM-STZ in placenta and amniotic fluid.



SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). AST (aminotransferase de aspartate), ALT (aminotransferase de alanine), CKL (creatine kinase), Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 6$). * $p < 0.05$ in comparison to SC group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

A Tabela 4 demonstra o peso e as medidas das placentas. Observa-se um aumento no peso nos três grupos GDM em relação ao grupo SC; e o grupo GDM+Glb apresentou maior medida de largura quando comparado ao grupo SC.

Tabela 4 – Measurements and weights of placentas in GDM-STZ.

Groups	Weight	Length (µm)	Width (µm)
SC	0,415 ± 0,09	8732,69 ± 1543,79	2518,55 ± 529,45
GDM+S	0,494 ± 0,143*	9019,47 ± 1036,43	2923,96 ± 293,70
GDM+Glb	0,499 ± 0,080*	9742,74 ± 1371,69	3517,74 ± 599,54*
GDM+Gla	0,462 ± 0,085*	10058,27 ± 976,51	3047,83 ± 474,59
	(F=5,854, P<=0,0022)	(F=1,185, P< 0,05)	(F=3,280, P<0,05)

SC (0.9% saline solution), GDM+S (Diabetic+saline solution 0.9%), GDM+Glb (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 1 to 19), GDM+Gla (Diabetic+100 mg/kg/day of *Ganoderma lucidum* from gestation day 9 to 19). Data are presented as mean± SD (n = 5). *p<0.05 in comparison to SC group, ^a in comparison to GDM+S group, ^b in comparison to GDM+Glb group one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's.

5 DISCUSSÃO

Diabetes é uma enfermidade metabólica onde um defeito na secreção ou na ação da insulina resulta em hiperglicemia. Esse aumento crônico de açúcar no sangue causa danos prolongados em vários tecidos e órgãos, especialmente nos olhos, rins, nervos, coração e nos vasos sanguíneos (DIABETES, 2011).

O Diabetes Mellitus Gestacional (GDM) é um tipo de diabetes que afeta gestantes e pode acarretar consequências com efeitos devastadores para a mãe e para o conceito, promovendo aumento do risco de perda fetal, complicações no parto, malformações congênitas, nascimento prematuro e tendência a desenvolver diabetes tipo 2 futuramente (WENDLAND et al., 2012).

Neste sentido as “Associações sobre Diabetes” preconizam o teste de glicemia em jejum logo no início do pré-natal para detectar possível aumento da glicemia, visto que os sinais clínicos da hiperglicemia podem ser confundidos com os sintomas iniciais da gestação, e a hiperglicemia pode causar danos maternos e fetais, ameaçando a gestação, se não controlada a tempo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Um rastreio mais significativo, o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) é preconizado entre a 24^ª e 28^ª semanas de gestação para todas as gestantes (METZGER, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2008).

Para a compreensão dos mecanismos do GDM e suas consequências para mãe e para o conceito, estudos pré-clínicos com a utilização de modelos animais são necessários e de grande importância na identificação de problemas maternos, malformações congênitas, alterações na fisiologia placentária, e no desenvolvimento fetal. O modelo *in vivo* mais utilizado para estudo do GDM é a indução do diabetes com a STZ, embora possam existir variáveis individuais das respostas ao diabetes neste modelo (DAMASCENO et al., 2014; LÓPEZ-SOLDADO; HERRERA, 2003).

A STZ é uma substância citotóxica para as células beta-pancreáticas, sendo capaz de anular sua função através do aumento dos fatores pró-

apoptóticos e acúmulo de substâncias reativas ao oxigênio (ROS), culminando em morte celular e diabetes (LEITER; LEE, 2005).

O pâncreas é um órgão que possui tanto a função exócrina através dos ácinos pancreáticos, como a função endócrina pelas Ilhotas de Langerhans. Existe uma variação estrutural macroscópica e histológica do pâncreas entre as diversas espécies animais utilizadas em estudo experimental, principalmente referente à distribuição das ilhotas pelo tecido pancreático. O rato apresenta ilhotas de tamanhos variados e distribuídas por todo órgão, sendo que as células β -pancreáticas produtoras de insulina se concentram no centro das ilhotas (WIECZOREK; POSPISCHIL; PERENTES, 1998).

Segundo Ma, Hsieh e Chen (2015); Rahar et al. (2011) e Yang et al. (2010), as β -glucanas presentes no *Ganoderma lucidum* parecem agir aumentando o fator que previne a apoptose e a atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo as lesões em células β -pancreáticas induzidas pela exposição à STZ.

Em nosso estudo o TOTG evidenciou a manutenção do GDM-STZ, pois os grupos diabéticos apresentaram aumento da glicemia em todos os tempos do teste, reproduzindo o que acontece no GDM não controlado. Entretanto o *Ganoderma lucidum* antes e após a STZ foi capaz de reduzir a resposta glicêmica à carga de glicose administrada e demonstrou um possível efeito protetor sobre o número de ilhotas de Langerhans. A hiperglicemia materna responsável pela hiperglicemia fetal acaba gerando estímulo prolongado nas células beta-pancreáticas fetais, culminando na depleção insulínica, hipoinsulinemia fetal, contribuindo para o baixo peso fetal em mães com diabetes severa (LÓPEZ-SOLDADO; HERRERA, 2003). Nossos resultados reproduziram o que ocorre entre mãe e feto no GDM, ou seja, a hipoinsulinemia materna ocasionando hiperglicemia plasmática e do líquido amniótico. O *Ganoderma lucidum* não foi capaz de reverter os efeitos da STZ sobre os níveis de insulina e de glicose materno-fetal, nos grupos tratados.

Das importantes alterações metabólicas do GDM, as alterações sanguíneas são muito preocupantes, pois o aumento do número de plaquetas e da adesão plaquetária, induzidos pela hiperglicemia, e consequentes alterações na coagulação, que logo no começo da doença, é capaz de

ocasionar complicações vasculares graves (YEOM; BYEON; LEE, 2016). Sendo assim, embora a hipercoagulabilidade seja um mecanismo fisiológico e adaptativo que ocorre em gravidez normal, o número aumentado de plaquetas no início da gestação pode auxiliar no diagnóstico precoce de pacientes GDM e pode ser de grande valia para triagem no TOTG (ALZHRANI; AJJAN, 2010; GORAR et al., 2017; SAHBAZ et al., 2016).

Um dos grandes responsáveis pelo aumento da coagulação no DM é o fator inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), o qual é secretado pelo fígado, adipócitos e células endoteliais, e no GDM também é secretado pela placenta (FARHAN et al., 2006; SAMAD; LOSKUTOFF, 1996). Em nossos resultados o *Ganoderma lucidum* promoveu uma redução no aumento do número de plaquetas nos animais GDM-STZ e redução quando associada à redução da resposta glicêmica à carga de glicose ao TOTG, indicam uma possível atividade protetora deste cogumelo.

Vitak et al. (2017) mostraram que o *Ganoderma lucidum* também foi capaz de restabelecer a relação que existe entre proteína reguladora e apoptose em glóbulos brancos visto que na condição diabética a morte celular programada possui uma resposta exacerbada, também promovendo a proteção das membranas dos eritrócitos, tendo um efeito antianêmico. Além disto, estes autores não observaram efeitos hematológicos tóxicos em animais saudáveis. Nossos resultados corroboram com estes achados embora não tenham sido observadas alterações na série branca.

Na China o cogumelo *Ganoderma lucidum* é popularmente conhecido por seus benefícios sobre todas as vísceras, o que o coloca em destaque na medicina tradicional chinesa (LIU, 1999). As enzimas ALT, AST e CK são importantes marcadores da função hepática, e quando aumentadas no sangue, caracterizam distúrbios viscerais, em especial distúrbios da função hepática, função renal e musculatura. Nas ratas GDM-STZ normalmente observa-se complicações hepáticas, que são expressas pelo aumento plasmático destas enzimas, decorrentes da desorganização no tecido hepático com alterações gordurosas, danos mitocondriais e vesiculações no retículo endoplasmático rugoso (ZAFAR et al., 2009). O perfil bioquímico das ratas GDM-STZ traçado neste estudo, por meio da correlação entre as análises de ALT, AST e CK do

soro materno, placenta e líquido amniótico, foi compatível com as lesões induzidas pela STZ, entretanto os grupos expostos ao *Ganoderma lucidum* apresentaram redução destas enzimas indicando um possível efeito protetor deste cogumelo sobre as células hepáticas. Além disto, os resultados das análises histológicas de fígado e rim maternos corroboram com os dados encontrados na análise bioquímica.

A dosagem de lipase no líquido amniótico tem sido empregada como marcador para gastrosquise em recém-nascidos, indicando que o sistema digestivo do feto entrou em contato com o líquido amniótico (BURC et al., 2004). Em nossos estudos não foram evidenciados aumentos de lipase no soro materno e na placenta das GDM-STZ. Entretanto, no líquido amniótico esta enzima apresentou-se aumentada, mesmo não sendo observadas lesões semelhantes à gastroquise nos fetos após abertura dos sacos gestacional.

Durante uma gravidez normal o metabolismo dos lipídeos se altera para suprir as necessidades energéticas maternas e fetais à medida que a gestação progride, sendo assim, um aumento no colesterol total, triglicerídeos e HDL-col são esperados (BELO et al., 2002). Entretanto, no GDM-STZ severo observa-se uma fraca resposta insulínica ao estímulo de carga de glicose, resultando em hiperglicemia e hipertrigliceridemia exagerada. Os triglicérides maternos não atravessam a barreira placentária, sendo a placenta responsável por correlacionar o triglicérides plasmático materno com o feto (HERRERA; BONET; LASUNCIÓN, 1998). Em gestantes diabéticas o perfil lipídico apresenta aumento do colesterol total acompanhado do aumento exagerado de triglicerídeos e há diminuição de HDL-col e aumento da LDL-col, essa lipoproteína apresenta ácidos graxos poli-insaturados, ficando sujeitos à maior peroxidação lipídica e gerando desequilíbrio no estresse oxidativo com consequente aumento de radicais livres (WENDER-OZEGOWSKA et al., 2011). Nossos resultados indicam que o *Ganoderma lucidum* foi capaz de alterar apenas os níveis de triglicérides nas mães e na placenta, o que no conjunto, parece não interferir com perfil lipídico materno-fetal no GDM-STZ.

Sinzato et al. (2012) observaram em seus estudos que o GDM-STZ leve acarreta alterações na decídua da placenta e isso gera aumento das perdas pré-implantação e embrionárias. Bequer et al. (2017) afirmaram que o GDM-

STZ promove dimensões diminuídas das placentas e maior porcentagem de filhotes pequenos para idade gestacional. No presente estudo observou-se aumento de peso de placenta e maior taxa de perdas pós-implantação dos grupos diabéticos quando comparadas controle. Entretanto nos fetos de mães tratadas com *Ganoderma lucidum*, os fetos apresentaram medidas superiores aos de mães GDM-STZ que receberam apenas a solução salina.

Hiperglicemia na gestação gera aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais são responsáveis por induzir o estresse oxidativo no ambiente intrauterino. Esse desequilíbrio no estresse oxidativo gera malformações congênitas, danos oxidativo no DNA mitocondrial fetal e da placenta em toda prole (DAMASCENO et al., 2014; JAWERBAUM; WHITE, 2010).

A catalase, GPx e GSH são biomarcadores de estresse oxidativo que em pacientes diabéticos, em virtude da síndrome metabólica, tendem a diminuir. Por outro lado, o MDA obtido pela reação com TBARS, dosa a peroxidação lipídica e tende a estar aumentado em pacientes diabéticos (PAN et al., 2014). Sudheesh; Ajith; Janardhanan (2013), observaram que o *Ganoderma lucidum* reduziu os danos causados pelo estresse oxidativo frente ao infarto do miocárdio, ao avaliarem sua função antioxidante através das dosagens de GSH e MDA. Nesse contexto, Yurkiv et al. (2015) evidenciaram aumento da atividade da catalase e aumento de GPx, em ratos diabéticos tratados com *Ganoderma lucidum*, quando comparados ao grupo controle diabético.

A avaliação de estresse oxidativo materno indica que o *Ganoderma lucidum* embora não tenha revertido totalmente os efeitos oxidantes da STZ, demonstrou um potencial para isto, uma vez que reduziu os níveis de MDA e aumentou a atividade da catalase. Pan e colaboradores (2014) também ressaltaram o potencial antioxidante do *Ganoderma lucidum* na avaliação da nefropatia diabética em ratos, pois o mesmo reduziu os valores de MDA e aumentou a atividade da catalase. Entretanto esta atividade antioxidante do *Ganoderma lucidum*, ficou mais evidente na avaliação das placentas.

Furukawa, Kuroda, Sugiyama (2014) descreveram a placenta como um órgão cuja função principal é de atuar como uma interface entre a mãe e o feto

em desenvolvimento, sendo de extrema importância em estudos de toxicidade reprodutiva.

As placentas de animais utilizados em estudos experimentais possuem diferentes tipos sendo a placenta da rata classificada como discoide relacionada à sua forma, e hemotricorial quando relacionada à sua estrutura histológica, sendo composta por quatro regiões principais: (1) Zona do labirinto: composta por três camadas de células trofoplásticas; (2) Zona basal: composta por três tipos de células, espongiotrofoblastos, células gigantes trofoblásticas e células de glicogênio; (3) Decídua: composta por células mesométricas e desempenha papel essencial no desenvolvimento da vascularização da interface decidual-placentar; (4) Glândula metrial: composta por células decidualizadas do estroma endometrial, células NK uterinas, artérias e espiraladas, trofoblastos originários de células de glicogênio e fibroblastos (DAVIES; GLASSER, 1968; ENDERS; CARTER, 2006; FURUKAWA et al., 2013; LEISER; KAUFMANN, 1994; SOARES et al., 2012; TAKATA; FUJIKURA; B, 1997). A hiperglicemia materna está intimamente associada com injúrias no desenvolvimento fetal (KISS et al., 2009). O aumento da apoptose e do estresse oxidativo resultantes da hiperglicemia, são causadores de malformações embrionárias (ERIKSSON UJ, CEDERBERG J, 2003; SIVAN E, LEE YC, WU YK, 1997).

Hsu et al. (2014) em seus estudos sobre doença renal crônica (DRC) em crianças, concluíram que o GDM, o sobrepeso materno e o baixo peso fetal ao nascimento eram responsáveis pelo aumento nos casos de DRC em crianças.

A hiperglicemia no GDM é responsável por causar efeitos deletérios significativos no cérebro fetal, pois leva a uma diminuição no número de células com consequente alteração na espessura da substância branca e substância cinzenta, além de inibir o ácido retinóico responsável pela diferenciação dos neurônios corticais e possui atividade antioxidante no sistema nervoso central (GULERIA et al., 2006; KHAKSAR; JELODAR; HEMATIAN, 2011). Em nossos estudos a exposição ao *G. lucidum* promoveu aumento das medidas do crânio fetal, aumento das medidas torácicas, aumento do comprimento crânio-caudal e da cauda Além disto este cogumelo foi capaz de melhorar a ossificação dos

membros fetais. Não foram evidenciadas alterações fetais marcantes em relação às análises histológicas renais e cerebrais.

6 CONCLUSÃO

Todos os dados tomados em conjunto, os quais correlacionam a evolução gestacional, o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento intrauterino de ratos, a fim de avaliar os efeitos do *Ganoderma lucidum* no diabetes gestacional induzido por estreptozotocina, indicam que este cogumelo liofilizado e na dose empregada possui importante atividade protetora, fortalecendo sua potencialidade nutricional e medicinal no diabetes.

REFERÊNCIAS

Apresentada conforme as normas da ABNT – NBR 6032.

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALZAHIRANI, S.; AJJAN, R. Coagulation and fibrinolysis in Diabetes. **Diabetes e vascular disease research**, v. 7, n. 4, p. 260–273, 2010.
- AMÂNCIO, F.; CRISTINA, N.; MENDONÇA, B. D. O. M. Consequências da diabetes gestacional no binômio mãe-filho Consequences of pregnancy diabetes in the binomial mother- baby Abstract : This study deal with a literature review that analyzes the. p. 1–11, 2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Gestational Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 27, n. 1, p. 88–90, 2004.
- AQUINO, M. M. A. et al. Revendo Diabetes e gravidez. **Revista ciencias médica**, v. 12, n. 1, p. 99–106, 2003.
- BATRA, P.; SHARMA, A. K.; KHAJURIA, R. Probing Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): A Bitter Mushroom with Amazing Health Benefits. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 2, p. 127–143, 2013.
- BELO, L. et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. **Atherosclerosis**, v. 162, n. 2, p. 425–432, 2002.
- BEQUER, L. et al. Experimental diabetes impairs maternal reproductive performance in pregnant Wistar rats and their offspring. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2017.
- BOH, B. et al. **Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds**. [s.l: s.n.]. v. 13
- BOH, B. *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-

- cancer and immunomodulatory drugs. **Rec. Pat. Anti-cancer Drug Discov**, v. 8, p. 255–287, 2013.
- BURC, L. et al. Amniotic fluid inflammatory proteins and digestive compounds profile in fetuses with gastroschisis undergoing amnioexchange. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 111, n. 4, p. 292–297, 2004.
- CHEN, B. et al. Triterpenes and meroterpenes from *Ganoderma lucidum* with inhibitory activity against HMGs reductase, aldose reductase and α -glucosidase. **Fitoterapia**, v. 120, n. May, p. 6–16, 2017.
- COMMISSION, C. P. **Pharmacopoeia of the People's Republic of China**. Beijing: [s.n.].
- DAMASCENO, D. C. et al. Streptozotocin-induced diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- DAVIES, J.; GLASSER, S. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta Anat (Basel)**, v. 69, p. 542–608, 1968.
- DE MELLO, M. 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.
- DIABETES, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. SUPPL.1, 2011.
- ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.
- ENDERS, A.; CARTER, A. Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition – a review. **Placenta**, v. 27, p. 11–16, 2006.
- ERIKSSON UJ, CEDERBERG J, W. P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers: animal and human studies. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 4, p. 79–93, 2003.
- FARHAN, S. et al. Fibrinolytic dysfunction in insulin-resistant women with previous gestational diabetes. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 5, p. 345–352, 2006.
- FRIZO, I. et al. Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake). **Reproductive Toxicology**, v. 48, p. 25–25, 2014.
- FRIZO, Í. **Efeitos do cogumelo *Lentinula edodes* (Shiitake) na exposição materno-fetal ao metotrexato**. [s.l.] Universidade de Sorocaba, 2014.
- FURUKAWA, S. et al. Background data on developmental parameters during the gestation period in rats. **J Toxicol Pathol**, v. 26, p. 83–88, 2013.
- FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 11–18, 2014.
- GALINDO, V; CAVALCANTI, N; LYRA, R. Definição, diagnóstico e classificação dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono. In: **Diabetes mellitus e doenças cardiovasculares**. [s.l.: s.n.].
- 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. S.; GROPPPO, F. C. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. **Pharmazie**, v. 61, n. 1, p. 79–80, 2006.

GORAR, S. et al. Comparison of thyroid function tests and blood count in pregnant women with versus without gestational diabetes mellitus. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 43, n. 5, p. 848–854, 2017.

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

GROTTO, D. et al. Assessment of the Safety of the Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes), in Rats: Biochemical, Hematological, and Antioxidative Parameters. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 18, n. 10, p. 861–870, 2016.

GULERIA, R. S. et al. Hyperglycemia inhibits retinoic acid-induced activation of Rac1, prevents differentiation of cortical neurons, and causes oxidative stress in a rat model of diabetic pregnancy. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3326–3334, 2006.

HERRERA, E.; BONET, B.; LASUNCIÓN, M. A. Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: POLIN, R. A. (Ed.). **Fetal and neonatal Physiology**. Philadelphia: [s.n.]. p. 447–458.

HSU, C. W. et al. Prenatal Risk Factors for Childhood CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 9, p. 2105–2111, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. Disponível em: <www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 26 nov. 2017.

JAWERBAUM, A.; WHITE, V. Animal models in diabetes and pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 5, p. 680–701, 2010.

KHAKSAR, Z.; JELODAR, G. A.; HEMATIAN, H. Morphometric study of cerebrum in fetuses of diabetic mothers. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 12, n. 3, p. 199–204, 2011.

KISS, A. C. et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 1, n. 1, p. 21, 2009.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exp Clin Endocrinol**, v. 102, p. 122–134, 1994.

LEITER, E. H.; LEE, C. Is There Evidence for Genetic Overlap Between Type 1 and Type 2 Diabetes? **Diabetes**, v. 54, n. 13, p. 151–158, 2005.

LIN, Z. B. **Modern Research of Ganoderma**. Beijing: [s.n.].

LIU, G. Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllophoromycetideae) in China. **Int J Med Mushrooms**, v. 1, p. 63–67, 1999.

LÓPEZ-SOLDADO, I.; HERRERA, E. Different Diabetogenic Response to Moderate Doses of Streptozotocin in Pregnant Rats, and Its Long-Term Consequences in the Offspring. **Experimental diabetes research**, v. 4, p. 107–118, 2003.

MA, H.-T.; HSIEH, J.-F.; CHEN, S.-T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. **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.

MCMULLEN, S. et al. Alterations in placental 11 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase (11 β HSD) activities and fetal cortisol:cortisone ratios induced by nutritional restriction prior to conception and at defined stages of gestation in ewes. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 717–725, 2004.
- 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. 251–260, 2007.
- METZGER, B. E. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care**, v. 33, n. 3, p. 676–682, 2010.
- MOLEY KH. Diabetes and preimplantation events of embryogenesis. **Semin Reprod Endocrinol**, v. 17, p. 137–51, 1999.
- 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.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; MINISTÉRIO, D. S. **Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1
- OYETAYO, O. V. Medicinal uses of mushrooms in Nigeria: Towards full and sustainable exploitation. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 3, p. 267–274, 2011.
- PAN, D. et al. A novel proteoglycan from Ganoderma lucidum fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 111–118, 2014.
- PATERSON, R. R. Ganoderma – a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1985–2001, 2006.
- RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 94, 2011.
- RAMIREZ-ANGUIANO, A. C. et al. Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. **J. Sci Food Agric**, v. 87, p. 2272–2278, 2007.
- READER, D. M. medical Nutrition therapy and lifestyle interventions. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. 188–193, 2007.
- SAHBAZ, A. et al. Comparison of the predictive value of plateletcrit with various other blood parameters in gestational diabetes development. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 36, n. 5, p. 589–593, 2016.
- SAMAD, F.; LOSKUTOFF, D. J. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 2, n. 5, p. 568–582, 1996.
- 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.
- SINZATO, Y. K. et al. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012.
- SIVAN E, LEE YC, WU YK, R. E. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. **Teratology**, v. 56, p. 343–9, 1997.

- SOARES, M. et al. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. **Placenta**, v. 33, p. 233–243, 2012.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Diretriz: Diabetes mellitus gestacional. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 6, p. 471–86, 2008.
- SUDHEESH, N. P.; AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Ganoderma lucidum ameliorate mitochondrial damage in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats by enhancing the activities of TCA cycle enzymes and respiratory chain complexes. **International Journal of Cardiology**, v. 165, n. 1, p. 117–125, 2013.
- TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; B, S. Ultrastructure of the rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **J.Reprod Dev**, v. 43, p. 13–24, 1997.
- TOLOSA, E. et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. 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. 1, p. 242, 2015.
- VITAK, T. et al. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 8, n. 5, p. 187, 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 of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 131–137, 2008.
- WACHTEL-GALOR, S. et al.) Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2. ed. Boca Raton (FL): [s.n.].
- WENDER-OZEGOWSKA, E. et al. Metabolic syndrome in type 1 diabetes mellitus. Does it have any impact on the course of pregnancy? **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 62, n. 5, p. 567–73, 2011.
- WENDLAND, E. M. et al. Gestational diabetes and pregnancy outcomes - a systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 12, n. 1, p. 23, 2012.
- WIECZOREK, G.; POSPISCHIL, A.; PERENTES, E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). **Exp Toxicol Pathol.**, v. 50, p. 151–172, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.
- WU, T.; XU, B. Antidiabetic and antioxidant activities of eight medicinal mushroom species from China. **Inte J Med mushrooms**, v. 17, n. 2, p. 129–140, 2015.
- XI, M. et al. Antioxidant and antiglycation properties of total saponins extracted from traditional Chinese medicine used to treat diabetes mellitus. **Phytother Res**, v. 22, p. 228–237, 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. 167–172, 2010.

- YANG, X. et al. Women with impaired glucose tolerance during pregnancy have significantly poor pregnancy outcomes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 9, p. 1619–1624, 2002.
- YEOM, E.; BYEON, H.; LEE, S. J. Effect of diabetic duration on hemorheological properties and platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21913, 2016.
- YURKIV, B. et al. Antioxidant effects of medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): evidence from animal studies. **Int J Med Mushrooms**, v. 17, n. 10, p. 943–55, 2015.
- ZAFAR, M. et al. Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 3, p. 719–725, 2009.
- ZOGNO, M. A.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Biochemical analysis of fetal fluids and cytology of the amniotic fluid of female mocó (*Kerodon rupestris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 228–235, 2004.

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 microorganismos 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 bethencourti</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>Polyplox</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



Reproductive Toxicology

Volume 72, September 2017, Page 43



P-26

Ganoderma lucidum and *Agaricus blazei* and its effects in pregnant rats with streptozotocin-induced diabetes: A morphological study of the fetuses

Fabia J.M. Viroel , Leticia F. Laurino, Thaisa B. Pickler, Marli Gerenutti

Introduction: Gestational diabetes mellitus (GDM) is a public health problem of global relevance, due to the increase in the rates of premature mortality of gestating women and newborns. The changes caused by GDM in the maternal organism expose the fetus to an unfavorable environment for its development. The follow-up of pregnant women with GDM includes metabolic control through adjustments, especially of their diet. Beta-glucans present in the mushrooms *Agaricus blazei* and *Ganoderma lucidum* appear to act by repairing STZ-induced pancreatic B-cell lesions, promoting insulin increase and decreased plasma glucose levels.

Methods: Pregnant rats received orally reconstituted lyophilized powder and dehydrated *Agaricus blazei* or *Ganoderma lucidum* mushrooms at daily doses of 100 mg/kg from gestation day 1 to 19; control group (Sc) e diabetic control group (Dc) received a saline solution. The animals of the control group received citrate buffer, and the other groups received STZ (40 mg/kg, i.v) on the eighth pregnancy day; blood glucose above 120 mg/dl was considered as moderate GDM-STZ. The uterus was removed through a caesarean section on the 20th day. The weight gain of the gestating women was evaluated. External morphology and morphometry examinations of the fetuses were immediately performed after the cesarean sections, whereas the skeletal analysis was carried out following the diaphanization.

Results: All of the animals with GDM-STZ presented a reduction of their weight gain when compared to the Sc group. Reduced forelimbs and hind limbs ossification, and unfinished ossification of the pelvis bones of the fetuses which were observed on the three GDM-STZ groups, compared to the non-diabetic ones. In the GDM-STZ groups that received *Agaricus blazei* or *Ganoderma lucidum*, these anomalies were reduced in comparison to the Dc group. The Dc group fetuses presented reductions in the measurements of skull, thorax, craniocaudal and tail when compared to those of the Sc group. However, the GDM-STZ mother's fetuses

treated with *Agaricus blazei* or *Ganoderma lucidum* presented increased anteroposterior measurements of the cranium, anteroposterior of the thorax, caudal skull and tail compared to the Dc group.

Conclusions: Mushrooms are not able to completely reverse the deleterious effects of STZ on the fetuses, but they have reduced the anomalies and raised the measures of the main morphological elements when compared to the untreated diabetic group. Financial Support: FAPESP 2015 / 24566-9 process and Prosup-Capes.

ANEXO D - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO EM REVISTA

Plant Foods for Human Nutrition
Therapeutic applications of Ganoderma lucidum: Progress and Limitations
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	QUAL-D-17-00817
Full Title:	Therapeutic applications of Ganoderma lucidum: Progress and Limitations
Article Type:	Review Article
Keywords:	Ganoderma lucidum; mushrooms; pathologies; therapeutic effect
Corresponding Author:	Marli Gerenutti University of Sorocaba Sorocaba, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Sorocaba
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fabia Viroel, Ms
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Fabia Viroel, Ms Stepfany Viana, Ms Meire Andrade, PhD Carolina Santos, PhD Rai Mahendra, PhD Angela Jozala, PhD Denise Grotto, PhD Marli Gerenutti
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Ganoderma lucidum presents different nomenclatures that change according to the countries where it is used. This mushroom has been used for more than 4 thousand years to treat different pathologies. It is used in different presentations and the dosage varies according to the pathology treated. There are many compounds that form its chemical constitution. In vitro assays emphasize its antitumor, immunomodulatory and antioxidant properties. In vivo studies highlight its properties of hepatoprotection and antiglycemic are also described. Although its therapeutic use is variable, its toxicity and safety in pregnancy, childhood and in the elderly, is still unknown. Thus, many studies are necessary to determine their safe and rational use in therapeutic.