

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIENCIAS
BIOLÓGICAS

TAIANA VARELA FERREIRA

COMPONENTES SANGUÍNEOS E PARÂMETROS
MORFOLÓGICOS DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS
TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Agaricus blazei **MURRILL**

Maringá

2016

TAIANA VARELA FERREIRA

**COMPONENTES SANGUÍNEOS E PARÂMETROS
MORFOLÓGICOS DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS
TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Agaricus blazei MURRILL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador

Professora Dr^a. Maria Raquel Marçal Natali

**Maringá
2016**

BIOGRAFIA

Taiana Varela Ferreira nasceu em Maringá/PR em 13/03/1982. Possui graduação em Nutrição pelo Centro Universitário de Maringá (2008), Especialização em Nutrição e Metabolismo na Prática Clínica pela UEL em 2010 e Fisiopatologia Humana pela UEM em 2012. Atua em uma Unidade Básica de Saúde como nutricionista estatutária pela Prefeitura Municipal de Mandaguaçu, desde 2010. Iniciou estágio no laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Maringá-PR no ano de 2013. Em 2014, ingressou no curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), em nível de mestrado, na Universidade Estadual de Maringá-PR, realizando estudos na área de diabetes e neurônios entéricos. Desenvolveu neste trabalho a avaliação do intestino delgado de ratos diabéticos tratados com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murril, com ênfase nos componentes sanguíneos e morfológicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir mais esta conquista em minha vida, sou imensamente grata por ter conseguido chegar até aqui.

À professora Dra. Maria Raquel Marçal Natali pela oportunidade, por ter aceitado me orientar. A tenho como um exemplo de mulher inteligente, profissional, compreensiva e sempre muito querida!

Aos colegas Fernando Vicentini e Maiara Morselli, que me ensinaram os primeiros passos no laboratório e posteriormente técnicas mais complexas.

Às técnicas do laboratório de Histologia, Maria Eurides, Maria dos Anjos e Maria Ângela, que me ajudaram no dia a dia, todas sempre disposta, principalmente nos dias de coleta!

Aos colegas de laboratório que ainda estão presentes ou que já partiram para novos desafios, Ana Paula, Débora, Lia Mara, Jean, Stephanie, Débora Rissato, Larissa, Maísa, Elaine, Alessandro, Carlos, Fernando, Paulo, Evandro, Marcelo, Bruna, Kátia e Carla pelos momentos juntos e pela troca de conhecimento e de ensinamentos!

Especial agradecimento à Dra. Ana Paula de Santi-Rampazzo, quem me guiou desde o início da pesquisa, foi atenciosa, companheira, amiga e sempre mostrando com muita competência cada etapa.

Ao meu marido e companheiro, pelo apoio e pelo seu amor, você me proporcionou condições para que eu estudasse.

Ao meu filho, por ser uma alegria na minha vida e motivo pelo qual me faz lutar.

Ao meu querido pai, pelo apoio, incentivo, referência de pessoa pelo seus princípios e caráter, professor que admiro e amo muito.

À minha mãe, *in memorian*, muito amor, muita saudade.

À minha madrasta e à minha sogra, por terem cuidado do meu pequeno inúmeras vezes para eu poder cuidar dos ratos e estudar!

Aos meus irmãos, às minhas cunhadas e aos meus sobrinhos que mesmo longe sempre estão torcendo por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudos.

À Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Ciências Morfológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração em Biologia Celular e Molecular, por fornecer as condições necessárias à elaboração desta dissertação.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Ednei;

Ao meu marido, Ricardo;

Ao meu filho, Igor;

Às companheiras de trabalho Débora e Ana Paula;

À minha orientadora Maria Raquel Marçal Natali.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um artigo científico. Avalia os efeitos do tratamento crônico (120 dias) do extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murrill, conhecido como cogumelo do sol, sobre os componentes sanguíneos e parâmetros morfológicos do jejuno de ratos diabéticos. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, o artigo foi redigido de acordo com as normas do periódico Plos One (Fator de Impacto: 3.234).

Taiana Varela Ferreira e Maria Raquel Marçal Natali. “Componentes sanguíneos e parâmetros morfológicos do jejuno de ratos diabéticos tratados com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murrill”.

COMPONENTES SANGUÍNEOS E PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Agaricus blazei* MURRILL

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) caracteriza-se pelo aumento das concentrações de glicose sanguínea circulante associada com anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Atualmente esta doença atinge cerca de 382 milhões de pessoas em todo o mundo e no Brasil são 12 milhões de indivíduos afetados. O DM1 apresenta complicações sistêmicas, como doenças cardiovasculares (DCV), insuficiência renal (IR), anemia e infecções. Além disso, transtornos do trato gastrointestinal são frequentes em portadores de DM1 e os sintomas relatados incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, disfagia, regurgitação, azia, constipação e diarreia, sendo que estes sintomas podem estar associados as alterações morfológicas. A utilização de compostos nutritivos e ricos em antioxidantes para a prevenção e/ou tratamento do diabetes são frequentemente relatados. Os cogumelos comestíveis possuem efeitos benéficos e são utilizados como suplementos alimentares em todo o mundo. O *Agaricus blazei* Murrill (ABM), possui propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, hipoglicemiante e antioxidante, além de ter um alto valor nutritivo. O objetivo deste estudo foi avaliar a evolução do quadro de diabetes e o efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murrill sobre componentes sanguíneos e parâmetros morfoquantitativos do jejuno de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina.

MATERIAIS E MÉTODOS: Basidiomas desidratados e triturados de *A. blazei* foram submetidos à extração hidroalcoólica, sendo que o filtrado resultante foi liofilizado e armazenado em freezer a -20°C. Posteriormente, o extrato hidroalcoólico foi avaliado quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos, proteínas e carboidratos, bem como o potencial antioxidante através do ensaio DPPH (1.1-difenil-2-picril-hidrazil). Foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos (*Rattus norvegicus*), massa corporal média inicial de 304 ± 4.35 gramas, sendo induzido o diabetes por injeção endovenosa de estreptozotocina (45mg/Kg) e tratamento com gavagem diária de extrato hidroalcoólico de *A. blazei* (200mg/Kg). Foram constituídos os seguintes grupos: normoglicêmicos

(N), diabéticos (D), normoglicêmicos tratados (NB) e diabéticos tratados (DB) com extrato de *A. blazei* durante 16 semanas. Todos os procedimentos experimentais envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal de Universidade Estadual de Maringá (Parecer 001/2015). Durante o período experimental foram monitorados a massa corporal e consumos de ração e água. Após 120 dias os animais foram eutanasiados e mensurados no comprimento naso-anal para obtenção do Índice de Lee, e coletadas amostras das gorduras retroperitoneal, periepídidimal e mesentérica, para pesagem. O sangue foi coletado para avaliação de glicemia, triglicérides, colesterol total e HDL, proteínas totais, albumina, globulinas, creatinina, ureia, as transaminases aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e hemograma. Após coleta e mensuração do comprimento do intestino delgado, amostras do jejuno foram fixadas e processadas para análise histológica (H.E), histoquímica (P.A.S) e imunohistoquímica (anti-serotonina e anti-PCNA). Posteriormente conforme a técnica foi realizada análise morfométrica da parede total (PT), túnica mucosa (TM), altura de vilosidades (AV), profundidade de criptas (PC), túnica muscular externa (MM), quantificação para células de Paneth, células caliciformes, células serotoninérgicas e células epiteliais intestinais em proliferação celular. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste Kolmogorov-Sminov ou Shapiro Wilk para verificação da normalidade dos dados, seguidos pelos testes de análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's para dados não paramétricos com auxílio do programa estatístico GraphPadPrism® 5.0. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados expressos como média \pm erro padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O extrato hidroalcoólico de *A. blazei* apresentou os seguintes componentes (mg/g extrato): compostos fenólicos totais (28.60 ± 0.55), proteínas (5.45 ± 0.01), carboidratos totais (375.50 ± 23.66), carboidratos redutores (245.40 ± 3.60) e não-redutores (130), além de potente atividade antioxidante ($EC_{50}=0.39$ mg/ml). O modelo de diabetes foi comprovado com elevação da glicemia em jejum e redução da massa corporal e peso de gorduras, índice de Lee e aumento do consumo de ração e água. Com relação aos parâmetros sanguíneos, o diabetes promoveu redução nos valores de HDL, albumina e aumento nas globulinas e ureia. A análise do hemograma indicou efeito do diabetes promovendo aumento na concentração do hematócrito e volume corpuscular médio, redução na hemoglobina corpuscular

média, concentração de hemoglobina corpuscular média e no número de plaquetas. Houve efeito do tratamento com *A. blazei* sobre a massa corporal final, consumo de ração e água, níveis de globulinas, ureia e número de plaquetas. Parâmetros morfométricos do jejuno de ratos diabéticos indicam aumento na PT, TM, AV, PC e número de células em proliferação além da reduzir a espessura da TMU e o número de células caliciformes, serotoninérgicas e de Paneth. O tratamento com *A. blazei* maximizou a morfometria jejunal com exceção da profundidade das criptas e interferiu na população de células caliciformes e em proliferação.

CONCLUSÃO: Concluiu-se que o tratamento com extrato hidroalcoólico de *A. blazei* (200mg/Kg) apresentou efeito positivo sobre o comportamento de polifagia, número de plaquetas e dinâmica das células caliciformes em ratos diabéticos tipo 1.

BLOOD COMPONENTS AND PARAMETERS OF RATS JEJUNUM MORPHOLOGICAL DIABETIC TREATED WITH EXTRACT *Agaricus blazei* MURRILL HYDROALCOHOLIC

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Diabetes mellitus type 1 (DM1) is characterized by an increase in circulating blood glucose concentrations associated with abnormalities in the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids. Currently this disease affects about 382 million people worldwide and Brazil are 12 million affected individuals. The DM1 has systemic complications such as cardiovascular disease (CVD), renal insufficiency (RI), anemia and infections. In addition, disorders of the gastrointestinal tract are common in DM1 and carriers reported symptoms include nausea, vomiting, abdominal pain, dysphagia, regurgitation, heartburn, constipation and diarrhea, being these symptoms may be associated as morphological changes. The use of compounds rich in nutritious and antioxidants for the prevention and / or treatment of diabetes are often reported. Edible mushrooms have beneficial effects and are used as nutritional supplements worldwide. The *Agaricus blazei* Murrill (ABM), has anti-cancer properties, anti-inflammatory, hypoglycemic and antioxidant. In addition to high nutritional value. The aim of this study was to evaluate the diabetes table evolution and treatment effect of hydroalcoholic extract of *Agaricus blazei* Murrill about blood components and morphoquantitative parameters do jejunum of rats with streptozotocin-induced diabetes.

MATERIALS AND METHODS: dehydrated and crushed Basidiomata *A .blazei* underwent hydroalcoholic extraction, and the resultant filtrate was lyophilized and stored in a freezer at -20 ° C. Subsequently, the hydroalcoholic extract was evaluated for its content of phenolic compounds, proteins and carbohydrates, as well as the antioxidant potential by DPPH assay (1.1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). 24 adult male Wistar rats were used (*Rattus norvegicus*), average initial body weight of 304 ± 4:35 grams, being induced diabetes by intravenous injection of streptozotocin (45 mg / kg) and treatment with daily gavage of hydroalcoholic extract of *A. blazei* (200mg / kg). The following groups were formed: normoglycemic (N), diabetic (D), normoglycemic

treated (NB) and treated diabetic (DB) with *A. blazei* extract for 16 weeks. The ethics committee approved all experimental procedures involving the use of animals for experimentation State University Animal Maringá (seem 001/2015). During the trial period, it was monitored body weight and food and water consumption. After 120 days the animals were euthanized, weighed and measured in the naso-anal length to obtain the Lee index, and collected samples of retroperitoneal fat, and mesenteric periepididymal for weighing. Blood was collected to assess blood glucose, triglycerides, total cholesterol and HDL, total protein, albumin, globulin, creatinine, urea, transaminases aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase and blood count. After collecting and measuring the length of the small intestine, jejunum, samples were fixed and processed for histological analysis (H.E), immunohistochemistry (P.A.S) and immunohistochemistry (anti-serotonin, anti-PCNA). Later as the technique was performed morphometric analysis of the total wall (PT), mucous membrane (TM), villus height (AV), crypt depth (PC), muscularis externa (MM), quantification to Paneth cells, goblet cells, serotonergic cells and intestinal epithelial cells in cell proliferation. Data were statistically analyzed using the Kolmogorov-Sminov test or Shapiro Wilk to verify the normality of the data, followed by the test analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's test for parametric data and Kruskal -Wallis and Dunn's post-test for nonparametric data with the help of statistical program GraphPadPrism® 5.0. The significance level was 5% and the results expressed as mean \pm standard error.

RESULTS AND DISCUSSION: The hydroalcoholic extract of *A. blazei* showed the following components (mg / g extract): total phenolics (28.60 ± 0.55), protein (5.45 ± 0.01), total carbohydrates (375.50 ± 23.66), reducing carbohydrates (245.40 ± 3.60) and non-reducing (130), and potent antioxidant activity ($EC_{50} = 0.39$ mg / ml). The diabetes model has been proven to increase blood glucose and reducing body mass and weight of fats, Lee index and increased consumption of food and water. Regarding the blood parameters, diabetes promoted reduction in HDL levels, albumin and globulins and increase in urea. The hemogram analysis indicated diabetes promoting effect of increasing the concentration of hematocrit and mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin reduced, mean corpuscular hemoglobin concentration, and latelets. An effect of treatment with *blazei* on the final body weight, feed intake and water, globulin, urea and platelets. Morphometric parameters of the jejunum of diabetic

rats indicate an increase in PT, TM, AV, PC, and the number of proliferating cells beyond reduce the thickness of TMU and the number of goblet cells, Paneth and serotonergic. Treatment with blazei maximized morphometry jejunal except crypt depth and interfered in the population of goblet cells and proliferation.

CONCLUSION: We conclude that treatment with hydroalcoholic extract of *A. blazei* (200mg / kg) showed a positive effect on the behavior of polyphagia, platelets and dynamics of goblet cells in diabetic rats.