



**Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Renan Garcia Michel

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA B (1→6) D-GLUCANA PRODUZIDA PELO FUNGO
LASIODIPLODIA THEOBROMAE MMPI SOBRE UM MODELO ANIMAL DE
DIABETES**

Guarapuava
2016

Renan Garcia Michel

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA B (1→6) D-GLUCANA PRODUZIDA PELO FUNGO
LASIODIPLODIA THEOBROMAE MMPI SOBRE UM MODELO ANIMAL DE
DIABETES.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

ORIENTADOR: PROF^o DR. CARLOS RICARDO
MANECK MALFATTI

CO-ORIENTADOR: PROF^o DR. WEBER
CLÁUDIO FRANCISCO NUNES DA SILVA

GUARAPUAVA

2016

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

M623a Michel, Renan Garcia
Avaliação do efeito da B (1→6) D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* mmpi sobre um modelo animal de diabetes / Renan Garcia Michel. -- Guarapuava, 2016
x, 61 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em Associação Ampla com Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências da Saúde, 2016

Orientador: Carlos Ricardo Maneck Malfatti
Coorientador: Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva
Banca examinadora: Carlos Ricardo Maneck Malfatti, Mario Antônio Alves da Cunha, guilherme Barroso Langoni de Freitas

Bibliografia


1. Ciências Farmacêuticas. 2. Glucana. 3. *Exopolissacarídeo*. 4. *Lasiodiplodia theobromae*. 5. Diabetes. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

TERMO DE APROVAÇÃO**RENAN GARCIA MICHEL**

Avaliação do efeito da β (1→6) D-Glucana produzida pelo fungo lasiodiplodia theobromae MMPI sobre um modelo animal de diabetes

Dissertação aprovada em 02/09/2016 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Maffatti, UNICENTRO
Presidente



Prof. Dr. Mario Antonio Alves Cunha, UTFPR
Membro



Prof. Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas, UNICENTRO
Membro

Guarapuava - PR
2016



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 12/2016


Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do pós-graduando Renan Garcia Michel Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

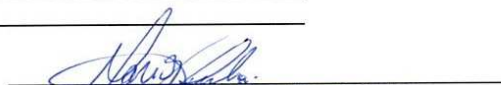
Aos dois dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis, às 13:00 horas, na sala de aula do Mestrado em Ciências Farmacêuticas do Campus CEDETEG, sob a presidência do Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do pós-graduando **Renan Garcia Michel**, constituída pelos professores: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti (orientador) - UNICENTRO, Prof. Dr. Mario Antonio Alves Cunha (Membro titular) – UTFPR e Prof. Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas (Membro titular) – UNICENTRO. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da Banca e ao candidato das normas que regem a defesa de Dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. A seguir, o candidato passou à defesa de sua Dissertação de Mestrado intitulada: "Avaliação do efeito da β (1 \rightarrow 6) D-Glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI sobre um modelo animal de diabetes". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento, tendo sido o candidato APROVADO. A Presidência ressaltou que a obtenção Título de MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias aplicadas à Farmácia está condicionada ao depósito da versão definitiva (impresa) da Dissertação, bem como das cópias em CD (PDF), com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador no prazo de trinta dias, comprovante de submissão de artigo científico, e demais exigências da legislação vigente. O não atendimento ao prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Esta Ata de Defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do Programa e o título obtido deverá ser homologado pelo Comitê de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, CPS. Nada mais havendo a tratar foi lavrada esta Ata e assinada pelos membros da Comissão Examinadora.
Guarapuava, 02 de Setembro de 2016.

Observação (se necessário): Revisar o texto, com maiores revisões e entregar o artigo antes do submissões em 20 dias e diligências em 30 dias

Alteração de Título: Sim Não

Novo título: _____


Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti,
UNICENTRO
Presidente


Prof. Dr. Mario Antonio Alves da Cunha
UTFPR
Membro Titular


Prof. Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas
UNICENTRO
Membro Titular

- Ata de Defesa homologada pelo Colegiado do PPGCF, conforme Ata da Reunião n° _____, de ____/____/____.
- Título homologado pela CPS, conforme Resolução n° _____, de ____/____/____.

Este documento não substitui o diploma.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Marli, que com muito esforço fez o papel de mãe e pai, ensinando valores a mim e aos meus irmãos.

Aos meus irmãos Renata e Rubens, por ser os melhores irmãos mais velhos que alguém poderia querer ter.

À minha namorada Fernanda, pela sua paciência, bom humor e pelos estímulos para me esforçar mais e me alegrar todos os dias.

Ao professor orientador Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, por ter reconhecido em mim o potencial para a pesquisa e ter aberto as portas do mestrado, e ajudado a mudar a rumo da minha vida.

Ao meu amigo e colega André Luiz Snak, pelo companheirismo nos experimentos, nas aulas, no trabalho e por dividir essa tarefa e tantas outras importantes comigo.

Ao meu amigo e colega de laboratório Luiz Augusto da Silva, pelos momentos de descontração, pelos importantes conselhos e principalmente pela motivação para seguir em frente.

À minha colega de laboratório Jéssica Wouk, pela prontidão e disponibilidade em ajudar em todas as situações.

Ao meu colega de trabalho Durinézio José de Almeida, pela ajuda com os dados e pela inspiração para ser um bom pesquisador.

Ao professor da Universidade Tecnológica do Paraná em Pato Branco, Dr. Mário A. A. Cunha, pelo auxílio na produção e disponibilização da Lasiodiplodana, β (1 \rightarrow 6) D-Glucana de nossa pesquisa.

A todos os meus amigos, pelo companheirismo diário, por me suportarem durante todo esse tempo, me ajudar a passar pelos momentos difíceis.

*Não reze para ter uma vida mais fácil, reze
para ser um homem mais forte.*

(John F. Kennedy)

Resumo

O diabetes é uma doença com alta taxa de morbimortalidade, que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, trazendo inúmeras complicações à saúde, repercussões sociais e econômicas, isso devido à maior propensão que os pacientes diabéticos têm em desenvolver complicações crônicas, como cardiopatias, nefropatias, neuropatias e retinopatias. Neste contexto, diferentes pesquisas podem auxiliar na busca de novas alternativas de tratamento para a melhoria da qualidade de vida dos diabéticos. Neste trabalho foi utilizada a β (1→6) D-Glucana produzida pelo *Lasiodiplodia theobromae* (MMPI) para o tratamento do diabetes e seus sintomas. Uma vez que as β -glucanas já possuem atividade biológica conhecida, dentre elas, a hipoglicemiante, atribuída à β (1→3) D-Glucana, além disso, as glucanas com ligação do tipo β (1→6) ainda são pouco estudadas. Foram utilizados 30 ratos adultos da linhagem Wistar tratados durante 28 dias. Os animais foram divididos em 5 grupos: CS – Controle Salinal (tratados com solução salina; DS – Diabético Salina (induzidos ao diabetes e tratados com solução salina; CP – Controle Positivo (induzidos ao diabetes e tratados com Metformina); G5 – Glucana 5mg (induzidos ao diabetes e tratados com β (1→6) D-Glucana 5mg/kg de peso) e G15 - Glucana 15mg (induzidos ao diabetes e tratados com β (1→6) D-Glucana 15mg/kg de peso). Foi administrado aloxana na concentração de 150 mg/kg de peso para o desenvolvimento do diabetes. Os animais foram avaliados semanalmente quanto ao peso e glicemia capilar de jejum, além do TOTG ao 14^o dia de tratamento. Ao final dos 28 dias de tratamento os ratos foram eutanasiados para a coleta de material para análises bioquímicas e quantificação de TBARS nos tecidos renais e hepáticos. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) na evolução do peso semanal, glicemia capilar e na tolerância oral a glicose, demonstrando diminuição da hiperglicemia de jejum e após carga de glicose, bem como melhor na evolução do peso dos ratos dos grupos G5 e G15 quando comparados ao grupo DS, nos parâmetros bioquímicos, não houve diferença estatística nos valores de creatinina e AST ($P > 0,05$), ainda houve aumento de ALT e ureia em todos os grupos diabéticos, nos marcadores hepáticos ainda houve aumento de proteínas totais e albumina nos grupo DS e G15, respectivamente ($P < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos na dosagem de TBARS do fígado ($P > 0,05$), já para o rim houve aumento de TBARS em todos os grupos diabéticos, com redução dos valores

nos grupos tratados com glucana ($P < 0,05$). O tratamento com $\beta(1 \rightarrow 6)$ D-Glucana se mostrou eficaz na diminuição da perda de peso, além de um efeito hipoglicemiante de jejum, aliado a melhoria da resposta à glicose. Ainda foi possível observar o aumento dos níveis de proteínas totais e efeito hipotrigliceridêmico, além de um discreto efeito protetor sobre a peroxidação lipídica dos rins.

Palavras-chave: Glucana, Exopolissacarídeo, *Lasiodiplodia theobromae*, Diabetes.

Abstract

Diabetes mellitus is a disease with high rate of morbi-mortality, that affects millions of people in the whole world, triggering several healthy complications, social and economic repercussions, due to the greatest propensity that diabetic patients have for developing chronic complications, such as heart diseases, nephropathies, neuropathies and retinopathies. In this context, different researches may assist in the search for new alternatives of treatment to improve diabetic patients' life quality. In the present study a β (1 \rightarrow 6) D-Glucan produced by *Lasiodiplodia theobromae* (MMPI) was utilized to treat diabetes and its symptoms. β -glucans already have well known biological activities, among them, a hypoglycemic one, attributed to β (1 \rightarrow 3) D-Glucan, in addition, glucans with β (1 \rightarrow 6) bonding are little studied. 30 adult Wistar rats were treated during 28 days. The animals were divided in 5 groups: SC – Saline Control (treated with saline solution); DS – Diabetic Saline (diabetic-induced and treated with saline solution); PC – Positive Control (diabetic-induced treated with metformin); G5 – 5mg of Glucan (diabetic-induced and treated with β (1 \rightarrow 6) D-Glucan 5mg/kg of body weight) and G15 - 15mg of Glucan (diabetic-induced and treated with β (1 \rightarrow 6) D-Glucan 15mg/kg of body weight). Alloxan was administrated in a concentration of 150 mg/kg of body weight to induce experimental diabetes in the animals. Body weight and fasting capillary blood glucose were weekly analyzed, and OGTT was performed in the 14^o day of treatment. In the end of the 28 days' treatment, euthanasia was made in order to collect biological material to biochemical analyses and quantification of TBARS in renal and hepatic tissues. There was statistical difference ($P<0.05$) in body weight evolution, capillary blood glucose and oral glucose tolerance test. A decrease of fasting hyperglycemia and also after the administration of glucose was demonstrated, as well as a better body weight evolution of the rats from group G5 and G15 when compared to the DS group. In biochemical parameters, no statistical difference was demonstrated to creatinine and AST ($P>0,05$). Moreover, there was an enhancement of ALT and urea levels in all diabetic groups. In hepatic biomarkers, there was a rise of total proteins and albumin to DS and G15 groups, respectively ($P<0,05$). No difference between groups was noticed in liver TBARS dosage

($P > 0,05$), but there was an increase in kidney's TBARS to all diabetic groups, with a reduction in the values of the groups treated with the glucan ($P < 0,05$). The treatment with $\beta(1 \rightarrow 6)$ D-Glucan was effective in body weight loss control, and revealed a hypoglycemic effect at fasting, allied to an improvement in glucose response. Thus, it was possible to observe an enhancement in total proteins levels and hypoglycemic effect, beyond a discreet protector effect over lipid peroxidation in kidneys.

Key-words: Glucan, Exopolysaccharides, *Lasiodiplodia theobromae*, Diabetes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. Revisão de Literatura	13
3.1. Diabetes Mellitus	13
3.2. Classificação do Diabetes Mellitus	14
<i>3.2.1. Diabetes Mellitus Tipo 1</i>	<i>14</i>
<i>3.2.2. Diabetes Mellitus Tipo 2</i>	<i>14</i>
3.3. Diagnóstico do Diabetes Mellitus	15
3.4. Modelos de diabetes mellitus experimental	16
3.5. Tratamento do Diabetes Mellitus	17
3.7. β-glucanas	18
3.8. Propriedades Farmacológicas dos Exopolissacarídeos Fúngicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Tipo de Pesquisa	23
4.2. Animais	23
4.3. Indução do Diabetes	23
4.4. Fungo e Preparo do Inóculo	24
4.5. Produção do Exopolissacarídeo	26
4.6. Preparo do Exopolissacarídeo	26
4.7. Preparo da Solução de Exopolissacarídeo	27
4.8. Protocolo Experimental	27
<i>4.8.1. Distribuição dos Grupos</i>	<i>27</i>
<i>4.8.2. Avaliação da Evolução Ponderal</i>	<i>28</i>

4.8.3. Dosagem de Glicemia	29
4.8.4. Teste de Oral de Tolerância à Glicose (TTOG)	29
4.8.5. Análises Bioquímicas.....	30
4.8.6. Glicose, Creatinina, Uréia, Abumina, Alanina Transaminase, Aspartato Transaminase.....	30
4.8.7. Avaliação do Perfil Lipídico.....	30
3.8.8. Determinação da Peroxidação Lipídica por Malondialdeído	30
3.8.10. Destinação dos Animais	31
3.9. Análise Estatística	31
3.11. Comitê de Ética no Uso de Animais	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Evolução do Peso dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1\rightarrow6) Glucana.....	33
4.2. Evolução da Glicemia e do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1\rightarrow6) Glucana	36
4.3. Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1\rightarrow6) Glucana.....	40
4.5. Avaliação da Peroxidação Lipídica dos Órgãos dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1\rightarrow6) Glucana	47
5. CONCLUSÃO	51
6. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes é tido como um mal que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, trazendo inúmeras complicações a saúde dos pacientes e gerando enormes gastos para os governos com saúde (SCHIMD; NEUMANN; BRUGNARA, 2003). O Diabetes Mellitus (DM) se destaca tanto por suas altas taxas de morbimortalidade como pelas repercussões sociais e econômicas, caracterizando-se como um dos principais problemas de saúde pública na atualidade (SOLLA et al., 2004).

O relatório da American Diabetes Association (ADA) de 2015, classifica o Diabetes Mellitus em três categorias: Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) e Diabetes Mellitus Gestacional (DMG).

O DMT1, assim como o DMT2, associa-se a um quadro clínico caracterizado por poliúria, polidipsia, polifagia, cetoacidose, perda de peso e astenia. Nestes tipos de diabetes devido ao comprometimento da insulina encontramos um metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas comprometido (GUYTON; HALL, 1997; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2016).

O DM pode ser controlado com mudanças de hábitos, atividade física e uso de medicamentos em associação com a insulina, os chamados hipoglicemiantes orais. Porém, devido aos efeitos colaterais e a toxicidade apresentada pelos fármacos hipoglicemiantes sintéticos utilizados cronicamente, há uma crescente procura por produtos naturais que possuam atividade antidiabética (MIRANDA, 2006).

Uma das possíveis alternativas para o tratamento do DM empregando produtos naturais seria o uso de fungos medicinais, uma vez que o fungo em natura ou seus extratos, quando suplementados na dieta em ensaios clínicos exibem diversas atividades biológicas, e entre elas a hipoglicemiante, sugerindo que os fungos contêm substâncias que atuam na regulação da glicose e do diabetes (NOVAES; FORTES; GARCEZ, 2004; HWANG et al, 2005; SULLIVAN; SMITH; ROWAN, 2006).

Estudos clínicos empregando glucanas demonstraram uma variedade de atividades biológicas destas moléculas, tais como atividade anticoagulante, antioxidante,

antiinflamatória. Sendo efetivas também no controle da glicemia, do colesterol e do risco de doenças cardiovasculares (SOLTANIAN et al., 2009; CARVALHO, et al., 2013; SYNYTSYA e NOVAK, 2013; MIRANDA et al., 2011).

Dentre os estudos com glucanas avaliando atividade biológica, ocorre com maior frequência o uso das glucanas com ligação do tipo β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6). Presentes em artigos e patentes, elas apresentam estruturas lineares, ramificadas ou cíclicas, possuindo atividade imunológica bem difundida (VASCONCELOS et al, 2008). Por esse motivo, destacam-se as glucanas que apresentam somente ligações do tipo β -D-(1-6), sendo consideradas incomuns ou raras, e ainda pouco estudadas, podendo apresentar novas e melhoradas atividades biológicas. (SHAHINIAN e BUSSEY, 2000).

Em função da necessidade de comprovação científica do uso da β (1 \rightarrow 6) D-Glucana para o tratamento de animais induzidos ao Diabetes Mellitus e fatores relacionados com o risco de Diabetes. O presente estudo utilizou a β (1 \rightarrow 6) D-Glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, tendo em vista que em estudos realizados por Carvalho e os outros (2013), enumeram as diversas atividades biológicas atribuídas aos polissacarídeos do tipo glucana. Outros estudos evidenciando o potencial das glucanas de origem fúngica para aplicação na terapia de doenças, foram realizados por Miranda e c (2011), constatando a atividade hipoglicemiante e hipocolesterolêmica de glucanas do tipo β (1 \rightarrow 3) produzidas por fungos. Aspectos que permitem confirmar a relevância e a importância deste estudo para o âmbito do meio científico, além de seus alcances sócio-econômicos, visando a contribuição para a redução dos impactos negativos da Diabetes Mellitus na sociedade.

Neste contexto, para melhoria da qualidade de vida dos diabéticos, diferentes pesquisas podem auxiliar na busca de novas alternativas de tratamento, testando a possível atividade hipoglicemiante da β -D-(1-6)-glucana, um exopolissacarídeo de origem fungica e de fácil obtenção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar estresse oxidativo, resposta metabólica e hormonal de um modelo animal de indução do diabetes, tratado subcronicamente com β (1 \rightarrow 6) D-Glucana, produzida pelo fungo *L. theobromae*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a evolução ponderal dos ratos tratados;
- Avaliar alterações na glicemia a partir do tratamento sub-crônico com β (1 \rightarrow 6) D-Glucana em um modelo animal de diabetes;
- Analisar os efeitos da β (1 \rightarrow 6) D-Glucana no perfil lipídico dos animais tratados;
- Avaliar possíveis alterações nos marcadores de função hepática nos animais tratados;
- Avaliar o nível de peroxidação lipídica nos tecidos do rim e fígado dos animais tratados com β (1 \rightarrow 6) D-Glucana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Diabetes Mellitus

Dados demonstram que o DM é uma doença fatal, com mortalidade em torno de 3 milhões de pessoas a cada ano em todo o mundo, e grande morbidade, devido à maior propensão que os pacientes diabéticos tem em desenvolver complicações crônicas, como cardiopatias, nefropatias, neuropatias e retinopatias (PETERSEN; SHULMAN, 2006). Evidências experimentais e clínicas, demonstram que as complicações advindas dos distúrbios metabólicos, provém principalmente da hiperglicemia (RANG et al., 2007). No Brasil o DM atinge um índice de 7,6% na população brasileira entre 30-69 anos, já na população acima dos 70 anos esse percentual sobe para 20% (IDF, 2012).

O DM associa-se a um quadro clínico caracterizado por poliúria, polidipsia, polifagia, cetoacidose, perda de peso e astenia, devido ao comprometimento da insulina encontramos um metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas comprometido (GUYTON; HALL, 1997; KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2016).

Vale ressaltar ainda outra complicação que surge nos casos em que indivíduos diabéticos fazem uso da insulina. Essa utilização pode desencadear um processo de hipoglicemia. Esse quadro de baixo nível glicêmico pode ocorrer devido a um excesso da quantidade do hormônio utilizado, à uma alimentação em quantidade insuficiente ou, até mesmo à falta de alguma refeição, quando for suprimida pelo indivíduo diabético (ANDERSON, 2000).

Nos pacientes acometidos pelo DM encontramos complicações que podem ter seu início retardado, se houver controle rigoroso da doença. As complicações mais significativas relacionam-se às pancreáticas, vasculares, oculares e neurológicas, advindas de distúrbios metabólicos causados pela hiperglicemia (ANDERSON, 2000; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2016).

As alterações pancreáticas contam com redução no número e tamanho das ilhotas de Langerhans, infiltração leucocitária das ilhotas, desgranulação das células b, sutil redução na massa de células das ilhotas de Langerhans e com substituição amiloide das ilhotas, sendo as últimas específicas do tipo 2 (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2016).

3.2. Classificação do Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus Tipo 1 aplica-se à doença caracterizada por destruição das células beta, com deficiência grave na secreção de insulina, sendo 95% dos casos causados por autoimunidade e 5%, de origem idiopática. Diabetes Mellitus Tipo 2 é a forma mais prevalente, heterogênea, relacionando-se mais frequentemente a defeitos na ação da insulina e secundariamente à disfunção das células beta. O Diabetes Mellitus Gestacional se assemelha ao DMT2 no que diz respeito à fisiopatologia, porém, surge durante a gravidez, e pode retornar na forma de DMT2 (MILECH, OLIVEIRA E VENCIO, 2015).

3.2.1. Diabetes Mellitus Tipo 1

O diabetes tipo 1 caracteriza-se por destruição das células beta pancreáticas, acredita-se por fatores genéticos, imunológicos e, possivelmente ambientais (exemplo vírus e toxinas) que combinados contribuam para a destruição das células beta (SMELTZER e BARE, 2005).

As células beta são responsáveis pela produção de insulina, devido a uma resposta auto-imune causada pelas células auto reativas T-helper 1. Como resultado, as células T-helper 1 inibem a proteção natural das células β -pancreáticas, ocorrendo aumento da secreção de citocinas, interleucinas pró-inflamatórias e interferon, causando inflamação e necrose das células β -pancreáticas (MONTI et al., 2009).

3.2.2. Diabetes Mellitus Tipo 2

Aproximadamente 90 a 95% das pessoas com Diabetes Mellitus apresentam o tipo 2, Diabetes Mellitus insulino independente, o qual resulta da sensibilidade diminuída à insulina (resistência à insulina). O diabetes tipo 2 ocorre mais frequentemente em pessoas com mais de 30 anos de idade e obesas (SMELTZER e BARE, 2005).

Em estágios elevados da doença, leva a falência das células β -pancreáticas, causando redução significativa na produção de insulina (PAULI et al., 2011).

Os possíveis mecanismos que cercam a resistência à insulina incluem polimorfismos genéticos na fosforilação da tirosina do receptor, inibição da fosforilação dos substratos IRS 1 e 2, e conseqüente redução na liberação de transportadores de glicose para a membrana celular (WILCOX, 2005).

3.3. Diagnóstico do Diabetes Mellitus

Os exames para diagnóstico do diabetes mellitus devem ser realizados nos indivíduos assintomáticos, a partir dos 45 anos de idade, sendo repetido a cada 3 anos. No entanto, se o indivíduo tiver Índice de Massa Corporal (IMC) maior ou igual a 25 Kg/m² e apresentar algum fator de risco adicional, como por exemplo ser hipertenso, ter apresentado diabetes gestacional, não praticar qualquer atividade física, dentre outros, recomenda-se que a idade para realização de exames para diagnóstico do diabetes mellitus seja menor que 45 anos ou o intervalo entre cada exame seja menor que 3 anos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Dentre os exames para o diagnóstico do diabetes podem ser citados os testes químicos da urina e do sangue (GUYTON; HALL, 1997). Nos exames sanguíneos, os critérios para diagnóstico do diabetes são três, e recomenda-se que seus resultados sejam confirmados no dia seguinte, através de uma técnica diferente da utilizada, inicialmente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O primeiro critério para diagnóstico se baseia no indivíduo que apresenta sintomas do diabetes, assim como sua glicose plasmática, colhida aleatoriamente, em qualquer momento do dia, sem jejum prévio, seja maior que 200 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O segundo critério classifica o indivíduo como diabético, quando sua glicemia de jejum for superior a 126 mg/dL (GUYTON; HALL, 1997; MILECH, OLIVEIRA E VENCIO, 2015; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). Quando os valores de glicose

plasmática, no jejum, são maiores ou iguais a 110 mg/dL e menores que 126 mg/dL, a glicemia é considerada alterada. Na maioria dos indivíduos, o nível de glicose sanguínea de jejum se encontra entre 80 e 90 mg/dL (GUYTON;HALL, 1997).

O terceiro critério para diagnóstico de diabetes é realizado através de outro teste sanguíneo, o de tolerância a glicose, no qual é oferecido ao indivíduo 75g de glicose anidra dissolvida em água e colhida uma amostra no soro ou plasma, nos tempos de 0,5; 1; 1,5 e 2 horas após a ingestão da glicose (GUYTON; HALL,1997; ANDERSON,2000; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O indivíduo é considerado diabético quando sua glicose plasmática 2 horas após a ingestão da glicose for igual ou maior que 200 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Em um indivíduo que não seja diabético, a glicemia que normalmente, é de 90 mg/dL, sobe para 140mg/dL e depois de 2 horas cai para um valor abaixo do valor encontrado, normalmente. Já em um indivíduo diabético, a glicemia de jejum é de cerca de 140 mg/dl, e sobe para um valor muito maior, além de voltar para o valor inicial apenas 4 a 6 horas após a ingestão, e nunca atingindo um valor abaixo do inicial (GUYTON; HALL, 1997).

3.4. Modelos de diabetes mellitus experimental

Diferentes modelos experimentais interessantes têm sido desenvolvidos pela comunidade científica em função do interesse em estudar as causas, os mecanismos e o controle da DM, tentando mimetizar as características clínicas da doença e trazendo informações importantes para explicar os complexos efeitos dessa patologia no organismo (LERCO, et al., 2003).

Os modelos existentes para indução de diabetes são classificados como dietéticos, genéticos e químicos (KIRSTEN et al., 2010).

No modelo de diabetes conhecido como “dieta de cafeteria”, o rato é induzido à obesidade pelo aumento de calorias na dieta, sabendo que a obesidade está relacionada

com a resistência à insulina, por ser um dos seus principais fatores de risco (HEYNE et al., 2009).

Os modelos genéticos de desenvolvimento espontâneo têm sido estudados em amplo espectro por 2 fatores patogênicos que se complementam: os defeitos imunológicos e a predisposição genética. Dois tipos de modelos são muito utilizados hoje em dia, sendo eles os ratos BB (*Biobreading*) e os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) (KIRSTEN et al., 2010).

Os modelos químicos são observados quando administradas drogas que levam à hiperglicemia no animal, devido a redução de células beta pancreáticas. Duas drogas são muito utilizadas para a indução do diabetes, a aloxana e a estreptozotocina (KIRSTEN et al., 2010).

A aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) tem retratado um quadro de diabetes insulino dependente. Após sua administração por via intraperitoneal (ip), entre as doses de 20 a 150 mg/kg, a droga é captada pela célula pelo transportador de glicose. Dentro da célula, a aloxana exibe afinidade aos compostos sulfídricos, ocorrendo produção de radicais livres, e conseqüente morte celular da célula β pancreática por um mecanismo de falência por liberação de insulina, envolvendo a glicoquinase e a concentração de Ca^{2+} intracelular. O interessante, é que esses radicais livres não causam danos às células hepáticas (LENZEN, 2008; SZKUDELSKI, 2001).

3.5. Tratamento do Diabetes Mellitus

O DM pode ser controlado com mudanças de hábitos, atividade física e uso de medicamentos em associação com a insulina, os chamados hipoglicemiantes orais. Porém, devido aos efeitos colaterais e a toxicidade apresentada pelos fármacos hipoglicemiantes sintéticos utilizados cronicamente, há uma crescente procura por produtos naturais que possuam atividade antidiabética (MIRANDA, 2006).

O tratamento do diabetes tem como objetivo manter o indivíduo com sua glicemia em níveis considerados normais, como por exemplo, sua glicose plasmática de jejum

deve se manter em 100 mg/dl e duas horas pós-prandial deve estar em 140mg/dl (HENRY, 2008).

Além da preocupação com a glicose plasmática, o tratamento visa também manter dentro dos níveis normais as taxas de colesterol, total, HDL e LDL, assim como de triglicérides. Outro objetivo do tratamento é que o indivíduo diabético apresente valores pressóricos dentro dos valores adequados e não apresente sobrepeso e muito menos obesidade, mantendo seu IMC entre 20 e 25 Kg/m² (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2008).

O tratamento do DM, tanto tipo 1 quanto tipo 2, deve levar em conta os níveis de glicemia do paciente, tempo de existência da patologia, fatores que influenciam o surgimento da síndrome de resistência à insulina, como a obesidade e inatividade física (SARTORELLI e FRANCO, 2003).

O tratamento do DM deve estar sincronizado com tratamentos que modifiquem o estilo de vida, alterando comportamento como o tabagismo, inatividade física e maus hábitos alimentares, e utilizando estratégias para controle de forma rápida ou aguda, no caso do uso de fármacos (HU et al., 2001).

3.7. β -glucanas

As β -glucanas são um tipo de cadeia de polissacarídeos constituídas por ligações glicosídicas $\beta(1-3)$ e $\beta(1-6)$ com alto peso molecular e facilmente encontrados na parede celular de diversos organismos, como plantas, fungos e bactérias (PARK et al., 2003). A estrutura das glucanas pode variar quanto ao número de unidades de açúcares na sua cadeia principal, ao tipo e a número de ramificações, além do tipo de ligação entre as unidades monoméricas que formam o polissacarídeo, podemos encontrar glucanas com ligações entre as suas unidades de glicose do tipo $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow4)$; $\beta(1\rightarrow3)$ ou $\beta(1\rightarrow6)$ (Figura 1), podendo conter ramificações ao longo da cadeia principal (BARBOSA et al, 2004; MORADALI et al, 2007).

Figura 1 – Estrutura das β -glucanas

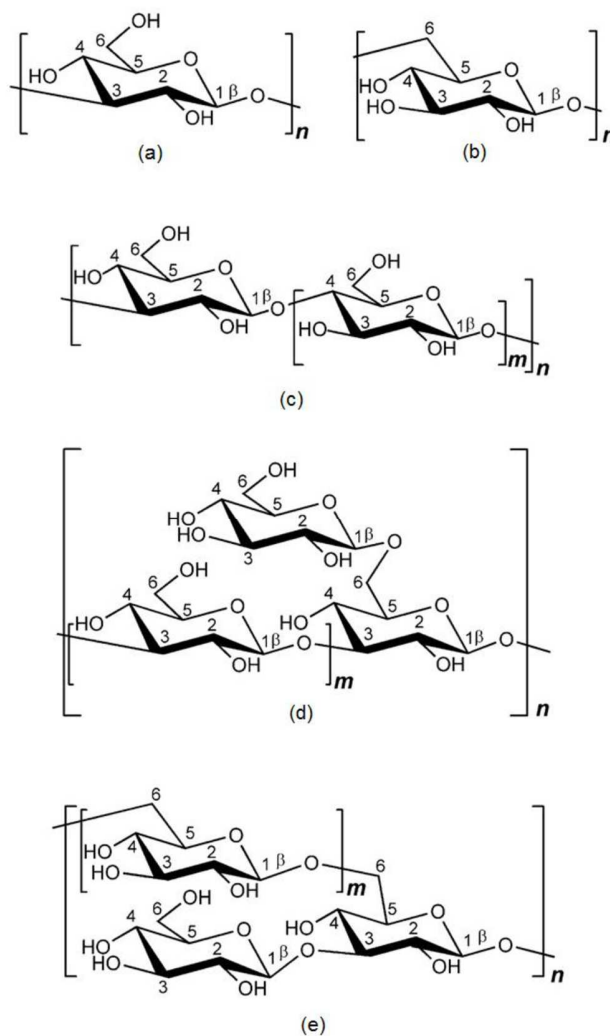


Figura 1 – Estrutura de β -glucanas fúngicas: (a) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana; (b) (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana; (c) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucana; (d) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana; (e) (1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana

Fonte: Adaptado de Synytsya & Novák (2013)

Esses polissacarídeos são facilmente encontrados na parede celular de diversos cereais, entre eles, a aveia e a cevada. Além de serem produzidos por microorganismos, como fungos, algas e bactérias (RIEDER et al. 2012; NOVAK & VETVICKA, 2009). Nos fungos, as β -glucanas podem ser encontradas na parede celular dos micélios, onde tem função estrutural, ou podem ser liberadas no meio de cultura, na forma de

exoplisscarídeo. Quando encontradas na parede dos fungos, tem como função manter a rigidez e a integridade da parede celular, lhe conferindo patogenicidade ou proteção (BAUERMEISTER, 2010).

A estrutura das glucanas pode variar quanto ao número de unidades de açúcares na sua cadeia principal, ao tipo e a número de ramificações, além do tipo de ligação entre as unidades monoméricas que formam o polissacarídeo, tal variação na estrutura das glucanas lhes confere diferentes respostas biológicas (CAMELINI et al., 2005). Um exemplo disso é a solubilidade das glucanas, que está correlacionada ao grau de ramificação da cadeia do polímero (SUTHERLAND, 1998). Outro exemplo mais claro da influência da composição da glucana na sua atividade biológica, é que devido ao peso molecular, organização estrutural em tripla hélice e complexidade da ramificação lateral, as glucanas extracelulares com ligações do tipo β (1 \rightarrow 3) apresentam atividade antitumoral, o que não se repete nas glucanas do tipo β (1 \rightarrow 4) e β (1 \rightarrow 6) (SCHIMID et al., 2001).

Essas moléculas são conhecidas pelo seu potencial de modificação da resposta biológica, estudos demonstraram atividades imunomodulatórias, antitumoral e anticarcinogênica (NITSCHKE et al., 2011).

A maioria das β -glucanas com atividade biológica é derivada de fungos, particularmente as leveduras e essas substâncias são denominadas de modificadores da resposta biológica, pois interagem e modificam a resposta imunológica (biorregulação) do hospedeiro, controlam a homeostase, regula o biorritmo, prevenindo várias doenças (CAMELINI et al., 2005 b; DIJKGRAAF, HUIJUAN e BUSSEY, 2002; JONG, 2002; ROSS et al., 1999; WASSER e WEIS, 1999). A atividade antitumoral pode estar associada aos polissacarídeos existentes na parede celular do corpo de frutificação (fruto), esses compostos podem estimular a formação de anticorpos que inibem o crescimento de tumores (MANZI e PIZZOFERRATO, 2000).

3.8. Propriedades Farmacológicas dos Exopolissacarídeos Fúngicos

Os EPS têm sido alvo de intensas pesquisas por possuírem atividade modificadora da resposta biológica, alterando positivamente a resposta do hospedeiro. Sendo, portanto, de grande aplicação para a terapia médica (TELLES, 2010). Estudos epidemiológicos têm mostrado diversos efeitos benéficos na saúde proporcionados pela ingestão de β -D-glucanas, incluindo uma associação inversa com o risco de doenças cardiovasculares (HORN et al, 2008).

Destaca-se que em estudos anteriores já foram descobertos uma gama variada de atividades biológicas atribuídas às glucanas, como atividade antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana, anticoagulante, hipoglicemiantes, antiviral e com atuação na diminuição da pressão arterial e na concentração de lipídios sanguíneos (ISHIBASHI et al., 2004; SARANGI et al., 2006; TELLES, 2010; FUKUDA et al., 2009). As β -glucanas fúngicas têm demonstrado atividade frente a infecções bacterianas, fúngicas e parasitológicas (NOVAK & VETVICKA, 2009). Além de outras modificações na resposta imune, como antiproliferativa (FANG et al. 2012;), imunomodulatória (ZYCOVA et al. 2013;), como probióticos (LAM & CHEUNG 2013)

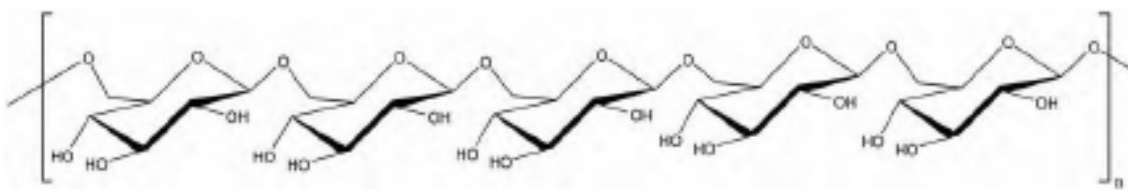
Segundo estudo de Jonker et al. (2010), a ingestão de β -D-glucanas se mostrou efetiva na redução do colesterol total e LDL-colesterol, sem influência nos valores de triglicerídeos e no HDL-colesterol. As (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucanas apresentaram atividade hipocolesterolêmica, além de atividade hipoglicemiante, tais efeitos são atribuídos ao fato das glucanas serem fibras dietéticas que aumentam a viscosidade dos alimentos no trato gastrointestinal, o que pode interferir na digestão dos carboidratos e diminuir a absorção da glicose e dos lipídios (AZARIDOU et al. 2014; DONG et al. 2011 REGAND et al. 2011L; SHARAFBAFI et al. 2014; SIKORA et al. 2013).

Uma glucana estruturalmente caracterizada como sendo do tipo β -D-(1-6) foi encontrada na parede celular de micélios de *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-05). Seu isolamento, geralmente é complicado, envolvendo múltiplos passos de extração

realizados em sequência, tal qual remoção lipídica por hexano, seguida por extração com água fria e quente, e extração por solução alcalina (CONRADI et al., 2008).

Uma β -D-(1-6)-glucana conhecida como lasiodiplodana, tem conformação de tripla hélice e é produzida pelo isolado fungico de *Lasiodiplodia theobromae* (MMPI) (Figura 2). A β -D-(1-6)-glucana produzida pelo *L. theobromae* (MMPI) é extracelular, sendo secretada no meio de cultura, durante fermentação submersa, e pode ser precipitada do líquido do meio de cultura apenas pela adição de etanol. Seu isolamento é considerado mais efetivo do que a extração da parede celular dos fungos (VASCONCELOS et al., 2008).

Figura 2 – Estrutura de β -(1→6)- β -D-glucana;



Fonte: Adaptado de Vasconcelos (2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Tipo de Pesquisa

Este estudo se caracteriza pelo desenho experimental por ensaio clínico terapêutico, distribuição randomizada da amostra, com controle das variáveis (GAYA et al., 2008).

4.2. Animais

Foram utilizados 30 animais para o desenvolvimento da pesquisa. Todos ratos machos, albinos da linhagem Wistar adquiridos no biotério da PUC-Curitiba, acondicionados em local apropriado durante o tempo de tratamento com o exopolissacarídeo em estudo.

Os animais foram mantidos em local com temperatura controlada, em torno de 21 +/- 2°C, com fotoperíodo de 12h claro / 12h escuro, acondicionados em gaiolas plásticas com cobertura de metal, sendo tratados com ração comercial para roedores. A água e a ração serão fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Os animais foram alojados em estantes apropriadas, dentro de gaiolas para ratos com base em polipropileno, autoclavável, resistente a ácidos, nas medidas de 41x34x16cm. Tampa de arame de aço carbono com tratamento de zincagem, malha 7,5mm, além de bebedouro de 700 mL específicas para animais de pesquisa.

4.3. Indução do Diabetes

Para indução do diabetes, os animais foram mantidos em jejum sólido por 24 horas. Após este período, realizou-se a pesagem e dosagem da glicemia de cada indivíduo na pré-indução. Os ratos foram induzidos ao diabetes por aloxana (125 mg/kg Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) diluída em solução salina (0,9%) administrada por via intraperitoneal (DIAS et al., 2011) (Figura 3). O preparo da solução

foi realizado em ambiente escuro, utilizando frasco âmbar envolvido por papel alumínio para evitar contato da luz, visto que o composto é fotossensível.

Figura 3: Indução do DM por injeção intraperitoneal de aloxana.



Fonte: Fotografia do autor.

A confirmação da instalação do quadro de diabetes foi feita três dias após a injeção, por coleta de sangue por punção caudal, analisado em glicosimêtro da marca Accu Cheack Advantage®, os animais que apresentaram glicemia superior a 150 mg/dL foram considerados diabéticos. Os controles receberam injeção de NaCl por via intraperitoneal, na dose única e equimolar da aloxana.

4.4. Fungo e Preparo do Inóculo

Foi utilizado um isolado fúngico de ascomiceto identificado morfológicamente como *Lasiodiplodia theobromae*, e classificado molecularmente *B. rhodina* (forma anamórfica) (SALDANHA et al., 2007). O fungo foi mantido em placas de Petri com ágar

batata dextrose e cloranfenicol a 4 °C (Figura 4), com transferências sucessivas a cada três meses, de acordo com Barbosa et al., 1996.

Figura 4 – Fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI cultivado em ágar BDA com cloranfenicol



Fonte: Kagimura (2014).

O inóculo foi preparado com micélios de *Lasiodiplodia theobromae* cultivados em placas de Petri com Meio Mineral Mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), agar (20g/L) e glicose (10g/L). Após 5 dias de incubação a 28 °C, fragmentos dos micélios foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de Meio Mineral Mínimo de Vogel e glicose (0,5 g/L) e cultivados por 48 horas a 28 °C sob agitação (180 rpm).

A pré cultura foi homogeneizada em mixer resfriado estéril por 30 segundo em velocidade máxima. O homogenato de células foi centrifugado (1250 x g / 10 min) e o micélio recuperado, diluído em solução salina fisiológica para uma absorvância de 0,4 à 0,5 em comprimento de onda de 400 nm. Uma alíquota de 4 mL da solução foi transferida

para um frasco Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de Meio Mineral Mínimo de Vogel e glicose (5 g/L) e cultivada em cultura submersa por 48 horas a 28 °C sob agitação (180 rpm) (STELUTI et al, 2004).

4.5. Produção do Exopolissacarídeo

Fermentação foi realizada por cultura submersa em bioreator de mistura STBR (Biostat B, B. Braun Biotech International, Alemanha). O bioreator foi preenchido com o meio nutriente, contendo glicose (20 g/L), extrato de levedura (2 g/L), 50 mL de inóculo e 1000mL Meio de Sais Minerais de Vogel (VOGEL, 1956).

O bioreator foi ajustado para temperatura de 28 °C, fluxo de ar de 0,8 vvc, tempo de cultivo de 96 horas e velocidade de agitação de 180 rpm. O pH, a temperatura, o tempo de agitação e o fluxo de ar foram monitorados durante todo o processo de fermentação.

4.6. Preparo do Exopolissacarídeo

Após o cultivo, o caldo produzido foi centrifugado (1250 x g / 15 min) para separação do micélio, o sobrenadante foi coletado e lavado com solução fisiológica estéril, filtrado e seco a 70 °C até adquirir massa constante.

O material foi tratado com uma solução com 3 volumes de etanol absoluto a 4 °C por 24 horas. O material precipitado foi filtrado, lavado com água deionizada, liofilizado e congelado a -20 °C (MIRANDA et al., 2008).

Figura 5: Etapas da produção de lasiodiplodana.

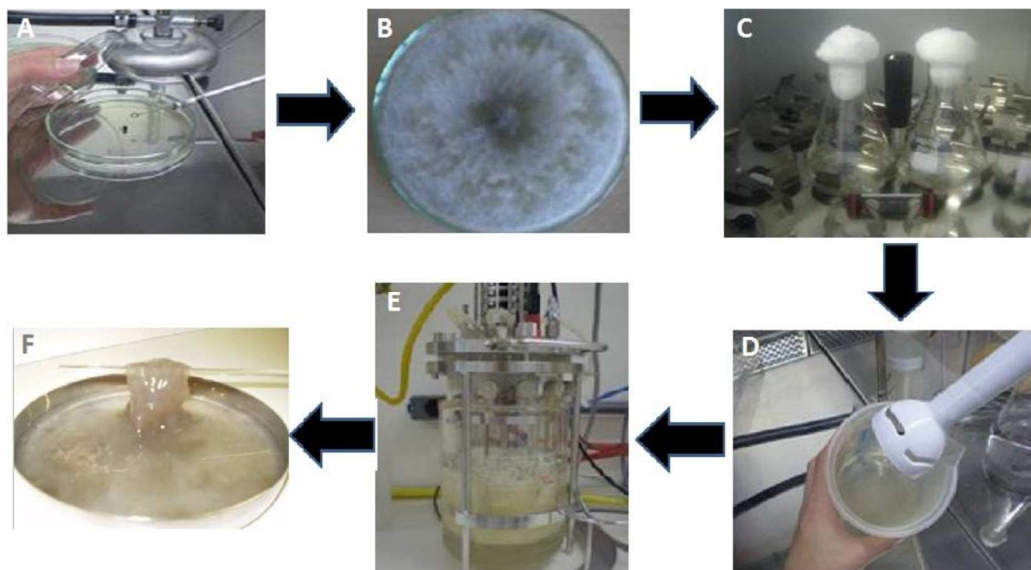


Figura 5 - (A, B, C e D) Etapas para o preparo do inóculo; (E) Produção do EPS em biorreator de mistura; (F) EPS dialisado.

Fonte: Turmina (2012)

4.7. Preparo da Solução de Exopolissacarídeo

Uma solução padrão de EPS foi preparada para os ensaios biológicos, com concentração de 6 g/L de EPS em solução salina e autoclavada a 121 °C por 20 min. Para confirmar as concentrações que foram utilizadas durante o experimento animal, foi feita a determinação dos açúcares redutores pelo método de Somogyi (1945) e açúcares totais pelo método de Dubois e os outros, 1956.

4.8. Protocolo Experimental

4.8.1. Distribuição dos Grupos

Os animais foram divididos em 5 grupos, compostos por 6 animais cada, com acondicionados em caixas com 3 animais. Os grupos foram divididos grupos controle e grupos tratamento.

Grupos controle: controle salina (CS), controle diabético (CD) e controle positivo (CP).

Grupos tratamento: Glucana 5 mg (G5) e Glucana 15 mg (G15)

- CONTROLE SALINA (CS) – composto por 6 animais, não diabéticos, recebendo por dia, via gavagem, solução salina fisiológica (NaCl, 0,9%), durante 28 dias;
- DIABÉTICO SALINA (DB) – composto por 6 animais, induzidos ao diabetes, recebendo por dia, via gavagem, solução salina fisiológica (NaCl, 0,9%), durante 28 dias;
- CONTROLE POSITIVO (CP) – composto por 6 animais, induzidos ao diabetes, recebendo por dia, via gavagem, Metformina (10 mg/kg), durante 28 dias;
- GLUCANA 5 mg (G5) – composto por 6 animais, induzidos ao diabetes, recebendo por dia, via gavagem, 5 mg/Kg de β (1 \rightarrow 6) Glucana, durante 28 dias;
- GLUCANA 15 mg (G15) – composto por 6 animais, induzidos ao diabetes, recebendo por dia, via gavagem, 15 mg/Kg de β (1 \rightarrow 6) Glucana, durante 28 dias;

Após os 28 dias do tratamento foi realizada punção cardíaca para a obtenção de amostras de sangue, após um jejum de 8 horas, todos os animais foram anestesiados com Ketamina (1 μ L por grama de peso) e Xilazina (0,5 μ L por grama de peso) para a realização do procedimento.

Foram determinados os parâmetros bioquímicos e hormonais. Após, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, sendo realizada coleta de rim, pâncreas e fígado para confecção de lâminas histológicas e avaliação da peroxidação lipídica, além de da pesagem dos órgãos e das gorduras retroperitoneais e periepididimal.

4.8.2. Avaliação da Evolução Ponderal

Para avaliação da evolução e acompanhamento do desenvolvimento dos animais, foram realizadas pesagens semanais dos animais durante os 28 dias de tratamento, além da medição o consumo de ração e água diariamente. As gaiolas foram abastecidas diariamente com 250g de ração e 1400mL de água, durante a reposição seguinte de ração e água, a quantidade consumida foi verificada.

4.8.3. Dosagem de Glicemia

Foram realizadas dosagens de glicemia de jejum dos ratos tratados semanalmente, e dosagens ao acaso também, em dias alternados aos das dosagens de jejum. Para a dosagem ao acaso foi coletada uma amostra de sangue dos ratos por punção caudal, e a glicemia foi medida utilizando um glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp. Indianapolis, Indiana, USA). Para a glicemia de jejum, o procedimento foi o mesmo, antecedido por um jejum de pelo 8 horas.

4.8.4. Teste de Oral de Tolerância à Glicose (TTOG)

Para o teste oral de tolerância à glicose os animais receberam, via oral, por gavagem, D-glicose (Figura 5) na dose de 1g/kg de peso corpóreo, após um jejum de aproximadamente 8 horas. As amostras de sangue foram obtidas da cauda dos animais após um pequeno corte e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0 (estado de jejum), 30, 60 e 120 minutos após a gavagem, utilizando um glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA).

Figura 6: Administração de D-glicose por gavagem.



Fonte: Fotografia do autor.

4.8.5. Análises Bioquímicas

Imediatamente após o término do tratamento, foram coletadas amostras de sangue (4 a 5 ml) por punção cardíaca para análise da glicemia, insulina, colesterol total e frações, triglicerídeos, ácido úrico, proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, ALT e AST. O sangue foi centrifugado à 2500 rpm por 10 minutos, e após foi analisado pelo equipamento específico para análise.

4.8.6. Glicose, Creatinina, Uréia, Albumina, Alanina Transaminase, Aspartato Transaminase.

As análises bioquímicas foram realizadas no equipamento automatizado da Mindray® (BS-200E), utilizando os Kits BioClin®. Com alíquotas de 500µL de soro. Os resultados foram expressos em UI/L para as transaminases, e em mg/dL para os demais dosagens. As amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante.

4.8.7. Avaliação do Perfil Lipídico

O perfil lipídico foi avaliado por meio de determinação dos triglicerídeos, colesterol total, e as frações de colesterol (LDL e HDL). A dosagem de colesterol total e triglicerídeo foi realizada pelo método enzimático de Trinder, a dosagem de HDL foi realizada por meio de método colorimétrico Acelerador - Detergente Seletivo. Os valores de LDL foram estimados por meio da equação de Friedewald.

3.8.8. Determinação da Peroxidação Lipídica por Malondialdeído

O grau de peroxidação lipídica foi determinado pela medição dos níveis de TBARS, seguindo metodologia descrita por Okahawa et al., (1979). Foi preparado um homogenato a 10% do tecido avaliado (rim, fígado ou pâncreas) em Tris HCL 30 mM

pH7,4. Em um tubo de ensaio serão adicionados 350 µL do homogenato, 350 µL de BHT, 800 µL de TBA (0,8%), 800 µL de ácido acético, 320 µL de SDS (8,1%) e 160 µL de água destilada.

Os tubos preparados foram agitados em vortex, mantidos em banho de água fervente por 1 hora e posteriormente resfriados em água corrente. Os tubos foram então centrifugados a 1200 rpm por 5 min. e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 535 nm para determinação da quantidade de malondialdeído/g de tecido.

3.8.10. Destinação dos Animais

Após a eutanásia, os animais foram mantidos sob congelamento em freezer. Os animais foram acondicionados até o descarte, que foi realizado por empresa especializada nesse tipo de descarte, vinculada à UNICENTRO. Os animais foram incinerados nessa empresa.

3.9. Análise Estatística

Os dados foram organizados em planilhas de Microsoft Office Excel 2007® e os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 2010®. Inicialmente foi realizada a análise de normalidade das variáveis utilizando teste *Shapiro-Wilk*, e após, foi aplicado o teste de Levene para homogeneidade, os dados se mostraram com distribuição normal, porém, não homogêneos, posteriormente foi realizado one-way ANOVA, considerando significância para $p < 0,05$. Para identificar as diferenças significativas foi utilizado o teste de LSD. Para a análise do TOTG, foi realizado Kruskal Wallis já que os resultados não foram normais nem homogêneos. Todos os resultados foram representados como média \pm EP na forma de gráficos ou tabelas.

3.11. Comitê de Ética no Uso de Animais

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA/UNICENTRO e aprovado sob o n.º 030/2015, assim promovendo o uso racional dos animais durante o experimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão apresentados os resultados de modificações de peso e consumo de alimento e água, evolução do perfil glicêmico, dados bioquímicos, peroxidação lipídica e análise histopatológica obtidos com os tratamentos aplicando subcronicamente diferentes concentrações de β (1 \rightarrow 6) Glucana.

O presente estudo mostra os efeitos da administração de β (1 \rightarrow 6) Glucana sobre os no modelo experimental de DM, na busca de evidenciar os efeitos do polímero frente aos sinais e manifestações clínicas da doença, através da observação das mudanças corporais e bioquímicas. Entre as características encontradas nos animais que foram submetidos a esse modelo, podemos citar as modificações metabólicas que geram alterações a nível bioquímico e corpóreo, como alteração do metabolismo da glicose, dos lipídeos e proteínas, além de mudanças nos marcadores de função renal e hepática (LEME et al., 2010; LERCO et al., 2003). Tais alterações puderam ser notadas nos ratos da pesquisa que foram submetidos a este modelo experimental.

4.1. Evolução do Peso dos Animais Tratados Subcronicamente com β (1 \rightarrow 6) Glucana

Os animais foram pesados semanalmente para mostrar a evolução do ganho de peso, avaliar o impacto do quadro de diabetes sobre os animais e comparar se o tratamento com glucanas consegue melhor o ganho de peso que é atenuado pelo DM.

Os resultados da evolução do peso corpóreo dos animais são apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Efeito da β (1 \rightarrow 6) Glucana sobre o peso corpóreo dos animais.

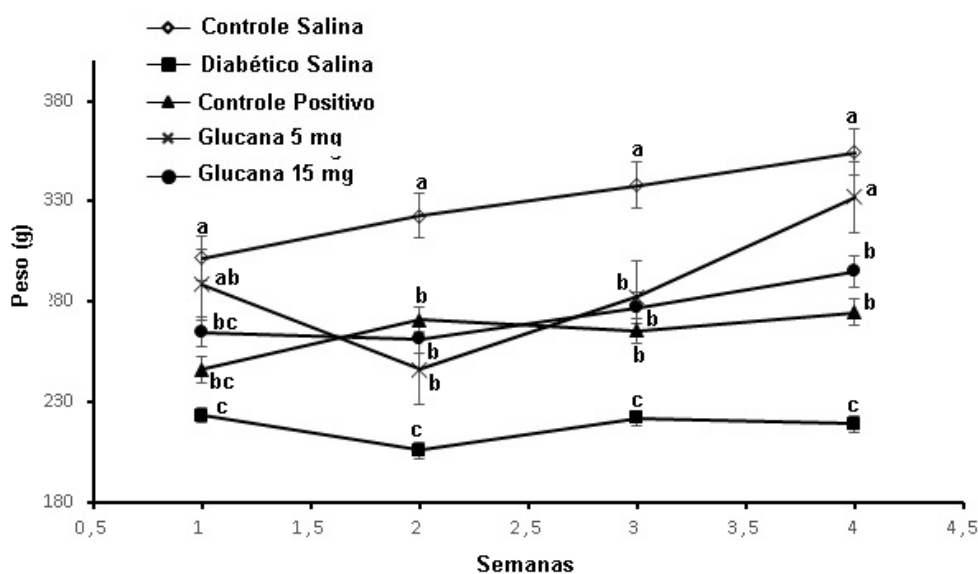


Figura 7. Avaliação da evolução ponderal dos ratos durante tratamento subcrônico com β (1→6) Glucana. n=6. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As letras acima dos pontos indicam as diferenças estatísticas de $P < 0,05$ usando ANOVA, com post test de LSD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante a primeira semana de experimento foi possível notar uma pequena diferença na evolução do peso dos animais, onde o grupo CS mostrou maior peso médio dos animais [(301,66 \pm 4,22)($P < 0,05$)], acompanhado pelo grupo G5 [(288,66 \pm 13,76) ($P < 0,05$)], o grupo G5 ainda ficou próximo aos grupos G15 [(265,04 \pm 12,74) ($P < 0,05$)] e CP [(246,33 \pm 12,20)($P < 0,05$)], estes dois últimos grupos ainda se mostraram estatisticamente iguais ao grupo DS [(223,5 \pm 25,7) ($P < 0,05$)], de menor peso médio.

Na segunda semana, houve aumento da diferença entre os grupos, com o grupo CS [(322,83 \pm 4,66)($P < 0,05$)] demonstrando maior peso médio dos animais. Os grupos CP, G5 e G15 [(CP = 271,16 \pm 14,13; G5 = 246,33 \pm 5,27; G15 = 261,62 \pm 14,57) ($P < 0,05$)] não apresentaram diferença estatística entre si. O grupo DS [(206,16 \pm 9,58) ($P < 0,05$)] continuou demonstrando o menor peso médio em relação aos demais grupos.

Na medição realizada na terceira semana os grupos apresentaram a mesma diferença de peso da semana anterior. Os resultados da pesagem realizada antes da eutanásia dos animais mostraram os grupos CS e G5 [(CS = 354,5 \pm 2,11; G5 = 332,33

$\pm 17,00$)($P<0.05$)] com o mesmo peso médio estatisticamente e com maior média de peso, seguidos pelos grupos G15 e CP [(G15 = $295,20833 \pm 16,88$; CP = $274,83 \pm 16,82$)($P<0.05$)], sem diferença estatística entre eles. Por fim, o grupo DS ($219,16 \pm 12,21$)($P<0.05$) demonstrou diferença estatística de todos os demais grupos, sendo o grupo de menor peso médio dos animais. Os resultados encontrados vão de acordo com os dados da OMS, segundo ela, o DM frequentemente leva a um quadro de rápida e significativa perda de peso aliada à fadiga.

A perda de peso é um sério problema decorrente do DM insulina-dependente, isso ocorre devido à degradação dos adipócitos e da musculatura para a produção de energia, uma vez que a glicose disponível na corrente sanguínea não consegue penetrar na célula para ser utilizada como fonte de energia (ENE, NWANKWO e SAMDI,2007). Os ratos diabéticos do presente estudo apresentaram perda de peso devido a diminuição da produção de insulina por esses ratos, o que leva a um estado de catabolismo de proteínas e gorduras, além de aumento da produção de urina e do aparecimento de glicose na urina (KIMBALL et al., 1994; BISWAS e ACHARYA, 2013)

Sabe-se também que ratos diabéticos possuem deficiência na produção de outros hormônios ligados ao crescimento, tais como o hormônio do crescimento, o glucagon e o polipeptídio pancreático (Howarth et al., 2008). Por este motivo os ratos diabéticos apresentaram um menor ganho de peso corpóreo se comparados ao CS.

O uso de glucanas em ratos saudáveis não modifica a o seu peso corporal, como citado no trabalho de Turmina (2012), utilizando camundongos saudáveis tratados com β (1 \rightarrow 6) Glucana durante 28 dias. Um estudo de Miranda (2006) também demonstrou não haver diferença no peso dos ratos tratados com glucanas frente aos não tratados.

Os resultados deste estudo vão de encontro com os de Silva (2010), onde a administração de β -Glucanas em ratos diabéticos reduziu a perda de peso dos animais quando comparados com ratos diabéticos sem tratamento.

4.2. Evolução da Glicemia e do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1 \rightarrow 6) Glucana

Foram realizadas dosagens da glicemia capilar de jejum dos ratos semanalmente e TOTG no 14^o dia de tratamento para avaliar a evolução do quadro de hiperglicemia e intolerância à glicose instalado nos ratos com DM.

Os dados da evolução da taxa glicêmica capilar dos ratos durante o tratamento com β (1 \rightarrow 6) Glucana são apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Efeito da β (1 \rightarrow 6) Glucana sobre o valor da glicemia capilar dos animais.

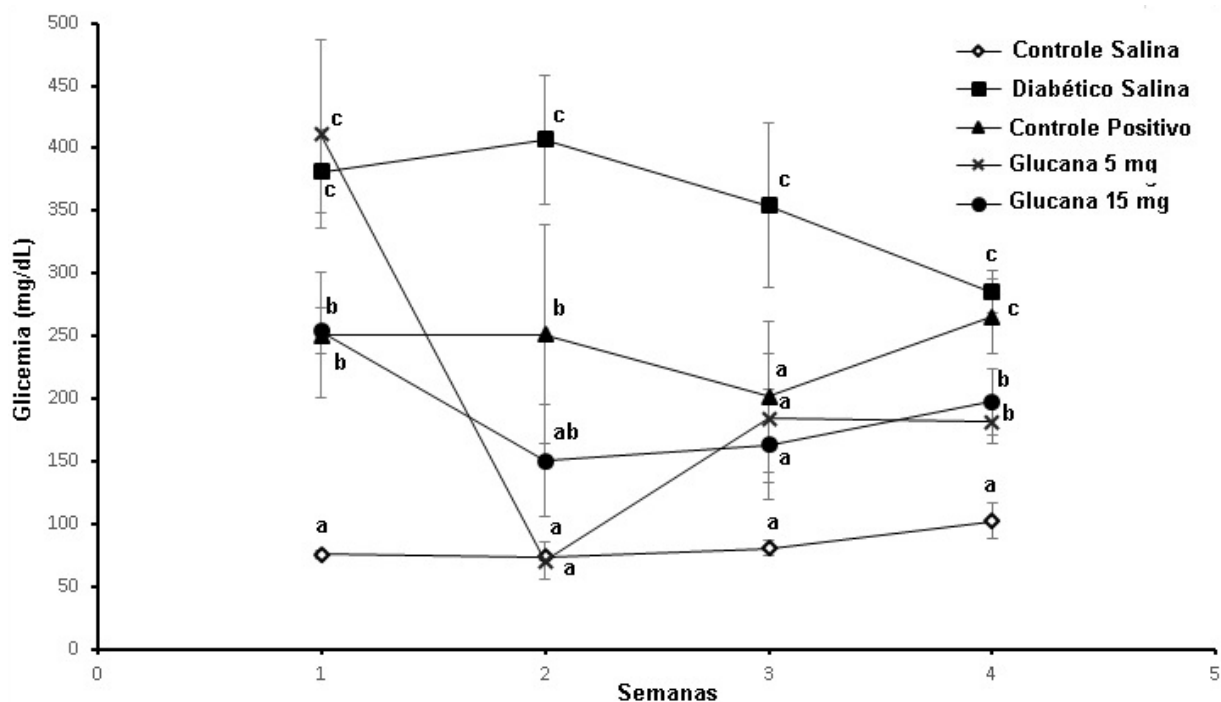


Figura 8. Avaliação da evolução glicêmica dos ratos durante tratamento subcrônico com β (1 \rightarrow 6) Glucana. n=6. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As letras acima dos pontos indicam as diferenças estatísticas de $P < 0,05$ usando ANOVA, com post test de LSD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados mostram que os valores de glicemia capilar ao final da semana 1 foram iguais entre os grupos DS, G5 e G15 [(DS = 382 ± 33 ; G5 = $411 \pm 75,2$; G15 =

$254 \pm 18,5$)($P < 0.05$)], sendo estes os grupos com maior média de taxa glicêmica e estatisticamente diferente dos demais. Os grupos G15 e CP foram iguais entre si [(G15 = $254 \pm 18,5$; CP = $251 \pm 50,6$)($P < 0.05$)], já o grupo CS demonstrou a menor média de taxa glicêmica, sendo diferente dos demais [(CS = $75 \pm 3,5$)($P < 0.05$)].

Na segunda semana o grupo DS se manteve com a maior taxa glicêmica média, mas dessa vez, diferente de todos os outros grupos [(DS = $407 \pm 51,7$)($P < 0.05$)]. O grupo CP se manteve igual ao grupo G15 [(CP = $252 \pm 87,1$; G15 = $150 \pm 44,7$)($P < 0.05$)]. O grupo CS demonstrou semelhança na taxa glicêmica média comparado ao grupo G5 [(CS = $74 \pm 2,7$; G5 = $70 \pm 14,7$)($P < 0.05$)], que tiveram redução da taxa glicêmica média da semana 1 para a semana 2.

Apesar da queda da taxa média de glicêmica do grupo DS na terceira semana, este grupo ainda se mostrou com a maior taxa média e estatisticamente diferente dos demais grupos [(DS = $354 \pm 65,9$)($P < 0.05$)]. O restante dos grupos não demonstrou diferença estatística significativa entre eles [(CS = $81 \pm 6,3$; G15 = $163 \pm 43,5$; G5 = $184 \pm 51,1$; CP = $202 \pm 60,7$)($P < 0.05$)].

Nos valores da glicemia obtida após a eutanásia dos animais, houve aumento da média da glicemia do grupo CP sendo este estatisticamente igual ao grupo DS [(265 \pm 29,9; DS = $285 \pm 16,5$)($P < 0.05$)], com a maior média da taxa glicêmica. Os grupos G5 e G15 se mostram iguais [(G5 = $181 \pm 17,0$; G15 = $198 \pm 26,4$)($P < 0.05$)]. Já o grupo CS se mostrou estatisticamente diferente dos demais com a menor taxa glicêmica [(CS = $102 \pm 14,2$)($P < 0.05$)].

Os dados do teste oral de tolerância à glicose dos ratos durante o tratamento com β (1 \rightarrow 6) Glucana estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Efeito da β (1→6) Glucana sobre o teste oral de tolerância a glicose dos animais.

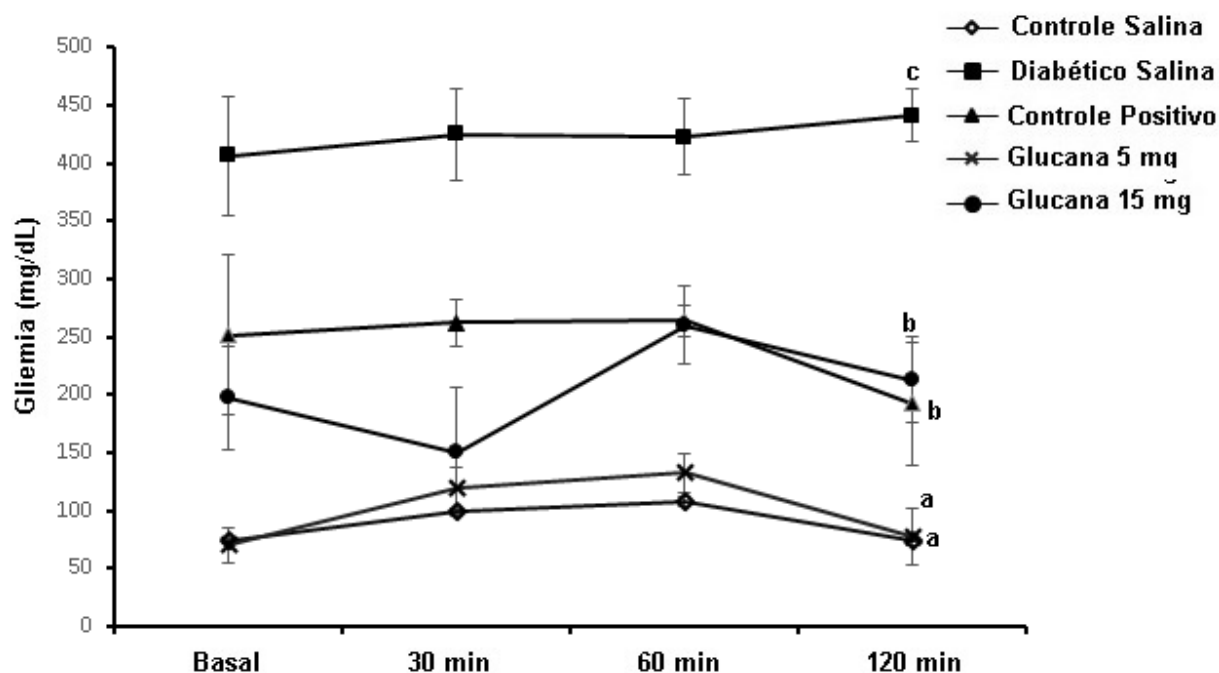


Figura 9. Avaliação da evolução glicêmica dos ratos durante tratamento subcrônico com β (1→6) Glucana expostos à uma carga de 1g de glicose por kg de peso n=6. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As letras acima dos pontos indicam as diferenças estatísticas de $P < 0.05$ usando Kruskal Wallis.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A comparação dos grupos expostos à uma carga padrão de glicose (1g/kg de peso corpóreo) realizada após 14 dias de tratamento demonstrou que a curva de resposta à glicose dos grupos CS e G5 são iguais estatisticamente, com menores valores, próximos aos valores considerados normais e diferentes dos demais grupos [(CS – Basal = 74 ± 3 ; 30 min = 100 ± 2 ; 60 min = 108 ± 4 ; 120 min = 74 ± 8) (G5 – Basal = 70 ± 15 ; 30 min = 119 ± 18 ; 60 min = 133 ± 17 ; 120 min = 78 ± 24) ($P < 0.05$)].

Os grupos CP e G15 também mostraram valores glicêmicos com semelhança entre si, mas diferindo do restante dos grupos [(CP – Basal = 252 ± 69 ; 30 min = 263 ± 20 ; 60 min = 264 ± 14 ; 120 min = 193 ± 53)(G15 – Basal = 198 ± 45 ; 30 min = 150 ± 55 ;

60 min = 260 ± 34 ; 120 min = 213 ± 37) ($P < 0.05$). , com a taxa glicêmica média considerada alta.

O grupo que apresentou maior taxa glicêmica média durante os 120 minutos de acompanhamento foi o DS [(DS – Basal = 406 ± 52 ; 30 min = 425 ± 40 ; 60 min = 423 ± 33 ; 120 min = 441 ± 23)($P < 0.05$), considerado diferente estatisticamente dos demais grupos.

No presente estudo foi empregado um método químico de indução de diabetes baseado na injeção intraperitoneal de aloxana, composto que apresenta citotoxicidade seletiva para as células beta. Como efeito, os animais desenvolvem um quadro de hipoinsulinemia 72 horas após a injeção (LERCO, 2003).

Foi possível notar uma acentuada hiperglicemia por parte dos ratos que receberam a indução por aloxana, todos apresentaram média glicêmica superior a 150 mg/dL após 72 horas da injeção do composto diabetogênico. Quadro que teve mudanças ao longo dos 28 dias de tratamento, onde nota-se uma diminuição dos níveis de glicose dos ratos que receberam tratamentos com glucana.

Os ratos tratados com glucana 15 mg/kg de peso demonstraram níveis de glicose mais baixos que dos ratos sem tratamento e tratados com metformina, sendo algumas vezes comparados ao grupo saudável. A média da glicose dos ratos tratados com glucana 5 mg/kg foi mais instável, pois na primeira semana se mostrava próxima a média dos ratos tratados com salina, mas com diminuição notável na segunda semana e ao longo das últimas semanas foi retornando a níveis próximos aos dos ratos tratados com salina.

Os resultados correspondem aos encontrados em outros trabalhos empregando o uso de glucanas no controle da hiperglicemia. Segundo Kiho et al. (1995) o uso oral de corpos de frutificação e do polissacarídeo produzido por *Tremella mesenterica* e *T. aurantia* reduziu a glicose sanguínea. Outro exopolissacarídeo produzido em cultura submersa pelo fungo *Phellinus baumii* também demonstrou diminuição da glicemia em ratos induzidos quimicamente ao diabetes (KIHO et al., 2000).

Em ratos diabéticos geneticamente houve prevenção da hiperglicemia e melhora da resposta periférica à insulina após a administração oral de uma ração com 20% de

cogumelos moídos (MAYELL 2001). O cogumelo *Agaricus blazei* é fonte de uma beta glucana passível de extração por água quente, a qual apresenta ação antihiperlipidêmica, além de contribuir para redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos e o aparecimento de arterosclerose em ratos diabéticos (KIM et al., 2005). O mesmo, utilizando uma glucana produzida pelo fungo *Agaricus blazei* e digerida por uma beta-(1–6)-glucanase, demonstrou que a atividade hipoglicemiante foi aumentada.

Segundo Paula et al, (2005), a inclusão de glucanas na dieta gera uma diminuição da absorção da glicose pelos enterócitos, levando a diminuição da glicose sanguínea (REYNA et al., 2003) induzindo a sensação de saciedade (LIATS et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; LUMAGA et al. 2012; BROCKMAN, CHEN; GALLAHER 2013).

Estudos de Tapola et al. (2005), Ludwig (2003) e Saris (2003) demonstraram a diminuição dos níveis de glicose pós-prandial após a ingestão de glucanas provenientes de aveia. Tanto o pico quanto a curva da glicemia foram mais discretos nos pacientes que receberam glucana do que nos que não receberam, eles também notaram redução da sensação de fome causada pela rápida diminuição da glicemia.

Outra hipótese para a diminuição da hiperglicemia está relacionada com a ativação da via PI3K/Akt, uma vez que a diminuição da PI3K/Akt é um dos fatores que levam a patogênese do diabetes e as beta-glucanas demonstraram sua capacidade de aumentar a atividade da PI3K/Akt (HSU et al 2002; CHEN e SEVIOUR 2007). Trabalhos demonstraram que o extrato de cogumelos ativa a PI3K/Akt (HILLER et al., 2000; LI et al., 2006; LEE et al., 2008). Outras beta glucana, como a lentinana também aumenta a atividade da PI3K/Akt (RICE et al., 2002; MINEO et al., 2003), porém nenhum destes trabalhos demonstram como isso funcionaria em ratos diabéticos e se as glucanas são capazes de gerar o mesmo efeito em modelos animais de diabetes.

4.3. Parâmetros Bioquímicos dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1→6) Glucana

Os dados dos parâmetros bioquímicos relacionados à função renal, função hepática e dano hepático dos ratos após o tratamento com β (1→6) Glucana estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeito da β (1→6) Glucana sobre a função renal, função hepática e dano hepático dos animais.

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CS	DS	CP	G5	G15
Creatinina (mg/dL)	0,47 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,62 ± 0,07	0,59 ± 0,04	0,58 ± 0,03
Uréia (mg/dL)	^a 38,2 ± 2,1	^b 64 ± 5,4	^c 92 ± 17,0	^{bc} 70,7 ± 6,5	^{bc} 75,4 ± 5,4
AST (UI/L)	167 ± 27,2	140 ± 26,7	171 ± 32,6	173 ± 26,3	119,4 ± 16,9
ALT (UI/L)	^a 50 ± 3,9	^b 107 ± 15,2	^b 116 ± 22,8	^b 88,7 ± 17,4	^{ab} 79 ± 16
Prot. Totais (g/dL)	^a 6,0 ± 0,00	^b 5,17 ± 0,31	^a 6,00 ± 0,00	^a 6,00 ± 0,00	^a 6,00 ± 0,00
Albumina (g/dL)	^a 2,98 ± 0,13	^a 2,85 ± 0,07	^a 2,95 ± 0,05	^a 2,83 ± 0,07	^b 2,58 ± 0,12

Controle Saudável – (CS); Diabético Salina (DS); Controle Positivo (CP); Glucana 5 mg (G5); Glucana 15 mg (G15). Letras diferentes (a, b e c) são estatisticamente diferentes entre os grupos ($P < 0.05$; Teste de Levene; ANOVA one-way).

Fonte: Dados elaborado pelo autor.

A dosagem de creatinina, um importante marcador de função renal, demonstrou que não houve significância estatística entre os grupos, portanto, nenhum dos tratamentos modificou a excreção deste marcador [(CS= 0,47 ± 0,02; DS = 0,54 ± 0,03; CP = 0,62 ± 0,07; G5 = 0,59 ± 0,04; G15 = 0,58 ± 0,03)($P < 0.05$)].

O valor de creatinina no soro dos ratos condiz com estudos prévios de padronização da função renal de ratos saudáveis. Segundo Dantas e os outros (2006) e (MELO et al. 2012), o valor de referência de creatinina no soro de ratos saudáveis foi de 0,50 ± 0,07 mg/dL, muito parecido com o valor encontrado no presente estudo. Outros estudos que fizeram a avaliação de parâmetros bioquímicos dos ratos da linhagem

Wistar encontraram valores médios de creatinina de $0,60 \pm 0,1$ mg/dL (RODRIGUES et al., 2006; SANTOS et al., 2010).

Porém quando comparamos os resultados do presente estudo com outros trabalhos que fizeram a dosagem de creatinina no soro de ratos diabéticos encontramos resultados contrastantes, segundo Facundo (2013), o quadro de diabetes eleva os valores de creatinina dos ratos quando comparados com ratos saudáveis.

Com relação à ureia, o grupo CS [$(38,2 \pm 2,1)(P<0.05)$] se mostrou diferente dos demais, com o menor valor médio. Este resultado condiz com o apresentado por Melo (2012) em seu trabalho de padronização dos valores de parâmetros bioquímicos em ratos, onde os valores de creatinina médio para ratos Wistar foi de $34 \pm 4,6$. Houve aumento dos valores de ureia nos demais grupos, sinal característico de ratos acometidos pelo DM, valores aumentos são encontrados em casos de alteração na capacidade de eliminação por insuficiência renal, catabolismo proteico e desidratação severa (HENRY, 2008). Os grupos G5 e G15 mg se mostraram iguais entre si [$(G5 = 70,7 \pm 6,5; G15 = 75,4 \pm 5,4)(P>0.05)$] e ao mesmo tempo iguais aos grupos DS e CP que demonstraram diferença estatística um do outro [$(DS = 64 \pm 5,4; CP = 92 \pm 17,0)(P<0.05)$].

Quando comparamos os resultados encontrados nesse estudo com os de Turmina (2012), que relatou não haver diferença no valor de ureia de ratos saudáveis submetidos ao tratamento com β (1 \rightarrow 6) Glucana, nota-se que a glucana não foi capaz de reduzir o aumento da ureia, característico do quadro de DM em ratos.

Em outro estudo, utilizando o extrato de cogumelos para o tratamento de ratos com diabetes, o tratamento foi capaz de reduzir os níveis de ureia dos ratos quando comparado aos ratos sem o tratamento com o extrato de cogumelos, rico em glucanas, quanto à dosagem de ureia, também não houve mudança nos resultados do tratamento com extrato de cogumelo frente aos ratos diabéticos sem tratamento, similar ao que foi encontrado no presente estudo (MASCARO et al., 2014).

As aminotransferases são consideradas bons marcadores de dano hepático, uma vez que os tecidos hepáticos contem quantidades consideráveis de tais enzimas e o aumento da atividade delas no soro é decorrente de sua liberação na corrente sanguínea

através do aumento da permeabilidade ou dano causado ao tecido do fígado, a ALT é considerada um marcador mais sensível ao dano hepático do que a AST, já que a ALT é liberada mais rapidamente na corrente sanguínea mesmo em danos menos severos, pois se ALT é encontrada em maior quantidade no citoplasma das células, enquanto a AST é liberada em danos mais severos ao tecido, devido ao fato de ser proveniente das mitocôndrias (HENRY, 2008).

Quando analisado o dano hepático, evidenciado dosagem da atividade de ALT e AST pode-se notar que não houve significância estatística entre os grupos para a dosagem de AST [(CS= 167 \pm 27,2; DS = 140 \pm 26,7; CP = 171 \pm 32,6; G5 = 173 \pm 26,3; G15 = 119,4 \pm 16,9 ($P>0.05$)]. Na dosagem de ALT é possível notar diferença estatística do grupo CS [(CS = 50 \pm 3,9)($P<0.05$)] em relação à maioria dos outros grupos, ficando igual somente ao grupo G15 (G15 = 79 \pm 16), por sua vez, ainda se mostrou estatisticamente igual aos demais grupos. Os grupos DS, CP e G5, não apresentaram diferença estatística entre si para este parâmetro [(DS = 107 \pm 15,2; CP = 116 \pm 22,8; G5 = 88,7 \pm 17,4)].

A partir destes resultados nota-se que há um dano superficial ao tecido hepático nos animais diabéticos, evidenciado pelo aumento da atividade da enzima ALT sem o concomitante aumento também da atividade da AST, considerada um marcador de dano mais profundo ao tecido hepático.

Segundo GHOSH e SURYAWANSHI (2001) e Pereira (2014), ratos induzidos quimicamente ao diabetes comumente apresentam elevações da atividade das enzimas ALT e AST, indicando disfunção hepático associada ao quadro de necrose tecidual. Estudos prévios demonstraram que o tratamento com EPS em ratos saudáveis não aumento os valores de aminotrasferases, o que indica que as glucanas por si só não geram efeitos hepatotóxicos (SHAH *et al*, 2011; TURMINA, 2012). No presente estudo foi possível observar que houve uma tendência de diminuição dos níveis de ALT nos ratos tratados com glucana 15 mg/kg de peso, sugerindo que nesta dosagem, o composto possa exercer uma atividade protetora dos hepatócitos, o mesmo tratamento também demonstrou significativa diminuição dos valores da glicemia dos ratos diabéticos, o que pode ser responsável pela diminuição do dano hepático.

Quanto aos marcadores de função hepática, houve diferença estatística para proteínas totais apenas o grupo DS [(DS = $5,17 \pm 0,31$ ($P < 0,05$))], diferindo dos demais grupos que não tiveram diferença estatística entre si [(CS = $6,0 \pm 0,00$; CP = $6,0 \pm 0,00$; G5 = $6,0 \pm 0,00$; G15 = $6,0 \pm 0,00$) ($P < 0,05$)], com diminuição da média desse parâmetro.

Em estudo avaliando os valores de proteínas plasmáticas em roedores de Harkness e Wagner (1993), consideraram a faixa de normalidade para proteínas totais entre 4,7 e 8,15 g/dL. Carvalho et al. (2009) em um trabalho sobre o perfil bioquímico de ratos da linhagem Wistar encontraram valores médios de proteínas totais de $6,15 \pm 0,07$. Ambos os valores vão de encontro com os resultados obtidos no presente estudo.

A redução dos valores de proteínas totais é uma das características apresentadas por ratos diabéticos, devido à mudança na forma produção de ATP, que na ausência de glicose intracelular, causada pelo DM, ocasiona o catabolismo de proteínas, associado ao comprometimento hepático e diminuição dos valores de GH, o que diminui a síntese e a disponibilidade de proteínas circulantes (SILVA et al., 2011; ASHRAF et al., 2013). Os ratos desta pesquisa apresentaram valores semelhantes de proteínas totais, exceto no grupo DS, fato já esperado pois se tratam de ratos diabéticos tratados apenas com solução salina. Ao mesmo tempo, todos os outros tratamentos obtiveram resultados considerados iguais, o que indica uma melhora na resposta ao diabetes dos ratos dos grupos CP, G5 e G15 quando comparados ao grupo DS, e similares ao grupo CS, composto por ratos saudáveis.

A albumina corresponde à aproximadamente 50% das proteínas plasmáticas, é uma proteína de alto peso molecular que desempenha funções de transporte de substâncias na corrente sanguínea, além de contribuir para a manutenção da pressão osmótica plasmática (HENRY, 2008). Situações como: doenças renais ou hepáticas, desnutrição e infecções prolongadas, costumam gerar diminuição nos níveis desta proteína (BURT e PORTMANN, 2011), por esse motivo a albumina é considerada um marcador de função hepática, ligada também ao rastreamento do status nutricional.

Na dosagem de albumina, apenas o grupo G15 [(G15 = $2,58 \pm 0,12$) ($P < 0,05$)] demonstrou redução dos valores séricos médios sendo considerado o único grupo com

significância estatística em relação aos outros tratamentos (CS = $2,98 \pm 0,13$; DS = $2,85 \pm 0,07$; CP = $2,95 \pm 0,05$; G5 = $2,83 \pm 0,07$).

Uma das características do DM é a hiperglicemia, tal condição resulta em lesões renais, evoluindo para nefropatia diabética, onde ocorre a perda de proteínas pela urina, incluindo a albumina (FIERRO, 2009; GREENE; WANG; MENON, 2005). Neste caso ocorre a hipoalbuminemia pela perda de albumina pela urina, situação não observada neste estudo, pois os ratos diabéticos não apresentaram diferença frente ao grupo saudável, apenas o grupo exposto a glucana 15 mg/kg registrou decréscimo nos valores de albumina.

Os dados dos parâmetros bioquímicos relacionados aos lipídeos e ácido úrico dos ratos após o tratamento com β (1→6) Glucana estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Efeito da β (1→6) Glucana sobre os lipídeos e ácido úrico dos animais

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CS	DS	CP	G5	G15
Colesterol Total (mg/dL)	^a 67,5 ± 5,9	^a 72,3 ± 1,7	^b 88,7 ± 8,4	^b 90,3 ± 0,3	^{ab} 75,4 ± 3,5
Triglicerídeos (mg/dL)	^a 48 ± 3,3	^c 86,7 ± 8	^c 116,3 ± 35,7	^{ab} 63,7 ± 12,4	^b 65,6 ± 7,1
Ác. Úrico (mg/dL)	^a 1,43 ± 0,48	^b 0,63 ± 0,07	^{ab} 0,82 ± 0,1	^b 0,57 ± 0,12	^b 0,58 ± 0,07

Controle Saudável – (CS); Diabético Salina (DS); Controle Positivo (CP); Glucana 5 mg (G5); Glucana 15 mg (G15). Letras diferentes (a, b e c) são estatisticamente diferentes entre os grupos ($P < 0.05$; Teste de Levene; ANOVA one-way).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na dosagem dos lipídeos pós-eutanásia, o colesterol total nos grupos CS, DS e G15 se mostraram iguais estatisticamente [(CS = $67,5 \pm 5,9$; DS = $72,3 \pm 1,7$; G15 = $75,4 \pm 3,5$)($P < 0.05$)], com os menores valores de colesterol total, o grupo G15 ainda se

mostrou igual aos grupos CP e G5 [(CP = $88,7 \pm 8,4$; G5 = $90,3 \pm 0,3$)($P < 0.05$)], que obtiveram as maiores médias de colesterol total.

O grupo CS apresentou os menores níveis de triglicerídeos junto com o grupo G5 [(CS = $48 \pm 3,3$; G5 = $63,7 \pm 12,4$)($P < 0.05$)] O grupo G5 ainda se mostrou igual ao grupo G15 [(G15 = $65,6 \pm 7,1$)($P < 0.05$)], os grupos DS e CP se mostraram diferentes dos demais e iguais entre si [(DS = $86,7 \pm 8$; CP = $116,3 \pm 35,7$)($P < 0.05$)].

Em estudos anteriores foi observado que pacientes acometidos pelo DM apresentam valores aumentados de colesterol total e também de triglicerídeos (RODRIGUES et al., 2000; NAHEED et al., 2003). A maioria dos ratos diabéticos do presente estudo apresentaram aumento dos valores de colesterol e triglicerídeos. Segundo Hobbs (2006), a principal dislipidemia encontrada em indivíduos diabéticos é a hipertrigliceridemia, devido ao aumento da taxa glicêmica, acompanhada pelos baixos níveis de insulina e de adiponectinas, o que leva ao aumento de ácidos graxos circulantes e da produção de VLDL, partículas ricas em triglicerídeos (JEPPESEN et al., 2003; HOBBS, 2006).

Outros trabalhos utilizando fungos produtores de glucanas, foi observado tanto a diminuição dos valores de colesterol total quanto de triglicerídeos. Maganani (2008) administrou uma β -Glucana produzida pelo fungo *Sacharomyces cerevisiae* em ratos com dieta hipercolesterolêmica e notou diminuição do colesterol total destes animais. O mesmo aconteceu em outro estudo, onde o tratamento com uma β -Glucana produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* se mostrou efetiva na diminuição do colesterol total e LDL- Colesterol (MIRANDA et al., 2011). Kim e os outros (2005), observaram atividade antihipercolesterolêmica e antihipertrigliceridêmica da glucana produzida pelo fungo *Agaricus blazei* frente à animais diabéticos.

A β (1 \rightarrow 6) Glucana utilizada neste estudo não mostrou atividade hipocolesterolêmica na concentração de 15mg/kg, o que não se repetiu na dose de 5 mg/kg. Ao compararmos os valores de triglicerídeos dos ratos tratados com glucanas, notamos que ambas não foram capazes de reduzir os níveis de triglicerídeos à níveis iguais aos dos ratos saudáveis, mas conseguiram reduzir os triglicerídeos quando comparados aos ratos tratados apenas com salina ou tratados com metformina.

Os grupos CS e CP se mostraram iguais estatisticamente [(CS = $1,43 \pm 0,48$; CP = $0,82 \pm 0,1$)($P < 0,05$)] no que diz respeito aos valores de ácido úrico, com as maiores dosagens. O grupo CP ainda se mostrou igual aos demais grupos [(G5 = $0,57 \pm 0,12$; G15 = $0,58 \pm 0,07$)($P < 0,05$)] com valores menores.

O ácido úrico é um produto final do metabolismo das bases púricas de ácidos nucleicos, considerado um importante marcador bioquímico de diversas doenças, tais como: doenças renais e cardíacas, hipertensão e diabetes (JEE, LEE e KIM, 2004; TSIΟΥFIS et al., 2005). Além de ser um marcador da degradação de purinas ou do metabolismo delas, o ácido úrico também participa da proteção contra o stress oxidativo, pois atua como molécula degradadora de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FREI; STOCKER; AMES, 1988; STINEFELT et al., 2005).

O nível de ácido úrico encontrado nos ratos induzidos ao diabetes foi menor do que o dos ratos saudáveis, apenas o grupo CP teve semelhança estatística com o grupo CS. A relação entre os níveis séricos de ácido úrico e o DM vem sendo estudada, e a conclusão desses estudos é que os valores de ácido úrico em indivíduos diabéticos é diminuída (WHITEHEAD et al., 1992; LIN et al., 2004).

Uma das hipóteses para a diminuição do ácido úrico em pacientes diabéticos está ligada à excreção desse metabólito. O ácido úrico é livremente filtrado nos glomérulos renais e logo sofre reabsorção na região proximal tubular, a glicose é um inibidor competitivo dessa reabsorção, sendo assim, a hiperglicemia levando a glicosúria, eleva a excreção do ácido úrico (GOLEMBIEWSKA et al., 2005).

4.5. Avaliação da Peroxidação Lipídica dos Órgãos dos Animais Tratados Subcrônicamente com β (1 \rightarrow 6) Glucana

Os dados de TBARS dos órgãos dos ratos após o tratamento com β (1 \rightarrow 6) Glucana estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Efeito da β (1 \rightarrow 6) Glucana sobre os valores de TBARS do fígado dos animais.

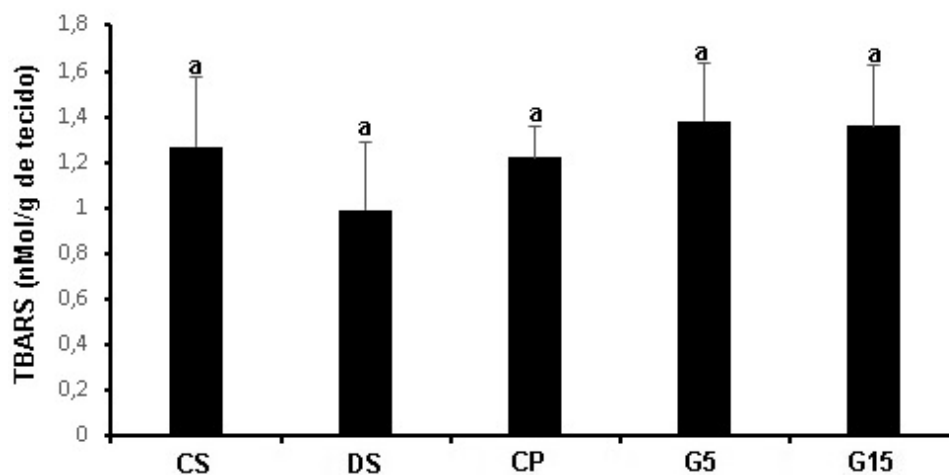


Figura 11 – Valores de TBARS do fígado dos animais após o tratamento subcrônico com β (1 \rightarrow 6) Glucana. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As letras acima dos pontos indicam as diferenças estatísticas de $P < 0.05$ usando ANOVA, com post test de LSD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Efeito da β (1 \rightarrow 6) Glucana sobre os valores de TBARS do rim dos animais.

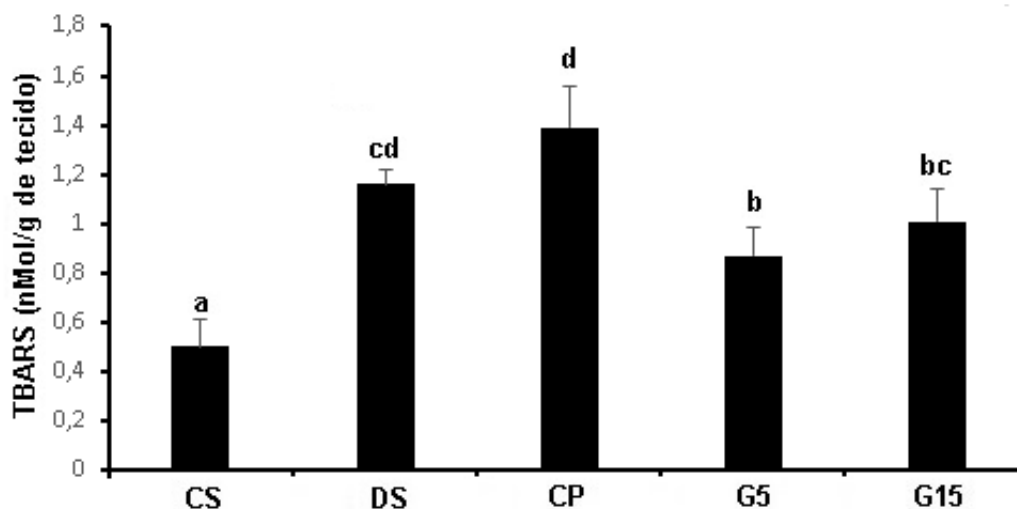


Figura 12 – Valores de TBARS do rim dos animais após o tratamento subcrônico com β (1 \rightarrow 6) Glucana. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As letras acima dos pontos indicam as diferenças estatísticas de $P < 0.05$ usando ANOVA, com post test de LSD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A dosagem de Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático não demonstrou diferença estatística em nenhum dos grupos [(CS = $1,27 \pm 0,3$; DS = $0,99 \pm 0,3$; CP = $1,22 \pm 0,14$; G5 = $1,38 \pm 0,25$; G15 = $1,36 \pm 0,26$) ($P < 0,05$)](ver Fig. 11).

No tecido renal, o valor de TBARS médio foi o mais baixo para o grupo CS ($0,5 \pm 0,1$). Houve um aumento de TBARS nos grupos G5 e G15 [($0,87 \pm 0,11$ e $1,0 \pm 0,13$) ($P < 0,05$)] quando comparados ao grupo CS. O grupo G15 ainda se mostrou estatisticamente igual ($P < 0,05$) ao grupo DS ($1,16 \pm 0,06$). O grupo DS também se mostrou igual ao grupo CP [($1,39 \pm 0,17$) ($P < 0,05$)](ver Fig. 12).

A detecção do stress oxidativo é realizada através da quantificação de compostos como o malondialdeído (MDA), substância formada pela degradação produtos celulares sob a ação de radicais livres (JANERO, 1990). A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico é um dos principais marcadores do stress oxidativo (LIU et al., 1997)

Estudos anteriores demonstram que o quadro de diabetes acarreta uma maior produção de radicais livres nos indivíduos acometidos pela doença, tais radicais reagem com membranas celulares e aumentam a peroxidação lipídica de diferentes órgãos (DUZGUNER e KAYA, 2007; VICKRAM e THIRUMALARAO, 2016).

Segundo Jangale e os outros (2013) e Pereira (2014), em ratos induzidos ao diabetes ocorre um aumento da peroxidação lipídica no fígado dos animais e aumento da concentração de TBARS. Em um trabalho avaliando o stress oxidativo causado em ratos diabéticos, também foi verificado aumento dos valores de TBARS (PALMA et al., 2014), fato não observado no presente estudo. No mesmo estudo de Palma e os outros (2014), houve aumento dos valores de TBARS no rim dos animais, resultados em concordância com Pereira (2014) e com a presente pesquisa.

O tratamento com a β (1 \rightarrow 6) Glucana não foi capaz de manter os níveis de TBARS iguais aos níveis dos ratos saudáveis, mas quando comparamos o grupo G5 com o grupo DS, houve diminuição de 25% dos níveis de TBARS e diminuição de 38% quando comparado ao grupo tratado com Metformina. Na concentração de 15 mg/kg de peso, a glucana não se mostrou diferente do grupo DS no que diz respeito ao TBARS, houve diminuição apenas quando comparamos com o grupo CP, onde a diminuição foi de 29%.

Outros trabalhos avaliando a capacidade antioxidante das glucanas demonstraram que estas apresentam uma capacidade de reagir com radicais livres e de diminuir os níveis de TBARS, como foi demonstrado por Yuan e os outros (2009), onde a β -glucana extraída de *Phellinus ribis* demonstrou redução dos níveis de TBARS acompanhado pelo aumento de enzimas antioxidantes no plasma. Em um trabalho com ratos induzidos quimicamente ao DM, foi observado que a suplementação com extrato de cereais rico em glucanas diminuiu o stress oxidativo e a hiperglicemia (MIRJANA et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

- O tratamento com β (1 \rightarrow 6) D-Glucana reduziu a perda de peso dos animais diabéticos.
- Avaliar alterações na glicemia a partir do tratamento sub-crônico com β (1 \rightarrow 6) D-Glucana em um modelo animal de diabetes;
- A (1 \rightarrow 6) D-Glucana, nas concentrações testadas, teve efeito hipoglicemiante tanto no jejum, como no TOTG.
- O estudo mostrou que a β (1 \rightarrow 6) D-Glucana teve efeito hipocolesterolêmico em ambas as concentrações, porém, sem efeito sobre os triglicerídeos, além do aumento das proteínas totais nos ratos diabéticos.
- Na concentração de 5 mg/kg de peso de β (1 \rightarrow 6) D-Glucana, o nível de peroxidação lipídica nos rins foi diminuída.

6. REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). **Standards of Medical Care in Diabetes**. Diabetes Care, v. 38, supl. 1, 590p, jan. 2015.

ASHRAF, Hossein et al. Effects of Aqueous Extract of *Berberis integerrima* Root on Some Physiological Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Irani J. of Pharm. Res**, v.12, n.2, p.425-434, 2013.

BARBOSA, Aneli; DEKKER, Robert; ST HARDY, Giles. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye poly R-478. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, 93-96, 1996.

BROCKMAN, David; CHEN, Xiaoli.; GALLAHER, Daniel. Consumption of a high bglucan barley flour improves glucose control and fatty liver and increases muscle acylcarnitines in the Zucker diabetic fatty rat. **European Journal of Nutrition**, Londres, v. 52, n. 7, p. 1743–1753, Mai 2013.

CARVALHO, Gabriel Domingues et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista CERES**, v. 56, 51-57, 2009.

CARVALHO, José Carlos Tavares. Biologic Activity and Biotechnological Development of Natural Products. **BioMed Research International**, 2013.

CONRADI, Maria de Lourdes et al. Structural characterization of the cell wall D-glucans from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydr Res**. v. 343, p. 793–798, 2008.

DANTAS, Jailson Araújo. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci Health Sci**. v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DE PAULA, A. C. et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. Poaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, p. 885-93, 2005.

DIAS, Tais Andrade. Protocolo para indução experimental de diabetes mellitus por aloxana em ratas - resultados preliminares. In: VIII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão PROEC-38, 2011, Goiânia.

DUBOIS, Michel. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350-356, 1956.

DUZGUNER, Vesile; KAYA, Sule. Effect of Zinc on the Lipid Peroxidation and the Antioxidant Defense Systems of the Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1481-1486, 2007

ENE, A. C.; NWANKWO, E. A.; SAMDI, L. M. Alloxan-induced diabetes in rats and the effects of black caraway (*Carum carvi* L.) oil on their body weight. **Res J Med Med Sci**. v. 2, p. 48-52, 2007.

FACUNDO, Aguinaldo Cândido da Silva. **Análise hematológica por hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol em ratos diabéticos portadores de infecção pulpar e/ou periodontal**. 2013. 71 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/123750>>.

FIERRO Juan Alberto. Nefropatía diabética: fisiopatología, diagnóstico, evolución clínica y epidemiología. **Rev Med Clin Condes**. v. 20, p. 639-650, 2009.

FREI, Balz; STOCKER Roland; AMES, Bruce. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proc Natl Acad. Sci**. v. 85, p. 9748-9752, 1988.

FUKUDA, Elaine Kaori et al. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GAYA, Adroaldo et al. **Ciências do Movimento Humano: Introdução à Metodologia da Pesquisa**. Porto Alegre: Artimed, 2008.

GHOSH, Sumana.; SURYAWANSHI, S. A. Effect of Vinca rosea extracts in treatment of alloxan diabetes in male albino rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 748-759, 2001.

GOLEMBIEWSKA, K. CIECHANOWSKI, K. SAFRANOW, K. KEDZIERSKA, J. KABAT-KOPERSKA, Renal handling of uric acid in patients with type 1 diabetes in relation to glycemic control, **Arch. Med. Res**. 36 (2005) 32–35.

GREENE T, WANG X, MENON V. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. **Kidn Internat**. v. 1, p. 93-9, 2009

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 883-894.1997.

HARKNESS, J. E; WAGNER J.E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**, 3ª ed. São Paulo, Roca. 238p, 1993.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20.ed. Barueri, SP: Manole, 2008. 1734 p.

HORN, L.; MCCOIN, M.; KRIS-ETHERTON, P. M.; BURKE, F.; CARSON, J. A.; CHAMPAGNE, C. M.; KARMALLY, W.; SIKAND, G. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. **Journal of the American Dietetic Association** v. 108, 287–331, 2008.

HOWARTH FC, CHANDLER NJ, KHARCHE S, TELLEZ JO, GREENER ID, YAMANUSHI TT. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. **Mol Cell Biochem**. 319:105-14, 2008.

HWANG, H. J.; KIM, S. W.; JOO, J. H.; KIM, H. O. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 76, p.3069-3080, 2005.

International Diabetes Federation. **IDF diabetes atlas**. 5. ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2012.

ISHIBASHI, K-I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; TAMURA, S.; OHNO, N. The solubilization and biological activities of *Aspergillus* b-(1-3)-D-glucan. **FEMs Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, p. 155-166, 2004.

JEE S.H., LEE S.Y., KIM M.T. Serum uric acid and risk of death from cancer, cardiovascular disease or all causes in men. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil** 11 185–191, 2004.

JACOBS, D. S.; KASTEN JR, B. L.; DEMOT, W. R.; WOLFSON W. L. **Laboratory Test Handbook**. Lexi Comp Inc., 1990.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9.6: 515-540, 1990.

JANGALE, N.M., DEVARSHI, P.P., DUBAL, A.A., GHULE, A.E., KOPPIKAR, S.J., BODHANKAR, S.L., CHOUGALE, A.D., KULKARNI, M.J., HARSULKAR, A.M., Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats, **Food Chemistry**, 2013.

KIHO T, KOBAYASHI T, MORIMOTO H, ET AL. Structural features of an anti-diabetic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia*. **Chem Pharm Bull**. 48:1793–5, 2000.

KIHO T, MORIMOTO H, SAKUSHIMA M, ET AL. Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. **Biol Pharm Bull.**18:1627–9., 1995.

KIM YW, KIM KH, CHOI HJ, ET AL. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnol Lett.** 27:483–7, 2005.

Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annu Rev Physiol.** ;56:321-48, 1994.

KUMAR,V; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 9ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, 216-226, 2008

LERCO, Mauro Masson et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.** v. 18, n. 2, p. 132-142, Mar. 2003.

LESAGE G, BUSSEY H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70:317–343, 2006.

LIATIS, S. et al. The consumption of bread enriched with betaglucan reduces LDL-cholesterol and improves insulin resistance in patients with type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism**, v. 35, n. 2, p. 115-120, Abr. 2009.

K.C. LIN, S.T. TSAI, H.Y. LIN, P. CHOU, Different progressions of hyperglycemia and diabetes among hyperuricemic men and women in the Kinmen study, **J. Rheumatol.** 31, 1159–1165, 2004.

LIU, J., YEO, H.C., DANIGER, S.J., AMES, B.N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography mass spectrometry compared with thiobarbituric acid Anal. Biochem. 245, 161/166. 1997

LUDWIG, D S. Dietary glycemic index and the regulation of body weight. **Lipids.** 38:117–21, 2003

LUMAGA, R. B. et al. Sugar and dietary fibre composition influence, by different hormonal response, the satiating capacity of a fruit-based and a β -glucan-enriched beverage. **Food and Function**, v. 3, n. 1, p. 67-75, Nov. 2012.

MARCELO BETTI MASCARO, CRISTIANE MIRANDA FRANÇA, KAMILLA F. ESQUERDO, MARX A. N. LARA, NILSA S. Y. WADT, AND ERNA E. BACH, Effects of

Dietary Supplementation with *Agaricus sylvaticus* Schaeffer on Glycemia and Cholesterol after Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 107629, 10 p, 2014. doi:10.1155/2014/107629.

MAYELL M. Maitake extracts and their therapeutic potential. **Altern Med Rev.** 6:48–60, 2001.

MELO, MGD, DÓRIA GAA, SERAFINI MR, ARAÚJO AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena.** 8:1-6, 2012.

MILECH, A.; OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2015.

MIRANDA, C. C. B.; ROBERT, F. H. D.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.

MIRANDA, C. C. B.; DEKKER, R. F. H.; ZAIA, C. T.; CASTRO, I.; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic, hypoglycaemic and hypocholesterolaemic activities in mice and rats. **Journal of Biotechnology**, v.131, p.58–64, 2011;

MIRANDA, C. C. B. **Produção de Botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipogliceminante e hipocolesterolêmica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina- UEL, 2006.

MIRJANA, M.; JELENA, A.; ALEKSANDRA, U.; SVETLANA, D.; NEVENA, G.; JELENA, M.; IBRAHIM, M.; ANA, Š.D.; GORAN, P.; MELITA, V. β -Glucan administration to diabetic rats reestablishes redox balance and stimulates cellular pro-survival mechanisms. **J. Funct. Foods.** 5, 267–278, 2013.

NAHEED, T. et al. Dyslipidemias in Type II Diabetes Mellitus Patients in a teaching Hospital of Lahore, Pakistan. **Pakistan Journal of Medical Sciences.** V. 19, n.4, p- 283-286, 2003.

NAVARINI, L.; BELLA, J.; FLABANI, A.; GILLI, R.; RIZA, V.; **Int. J. Biol. Macromol.** v.19, p. 157 – 175, 1996.

NOVAES, M. R. C. G.; FORTES, R. C.; GARCEZ, L. C. Cogumelos Comestíveis da família *Agaricaceae*: Aspectos nutricionais e atividade farmacológica no câncer. **Revista Sociedade Brasileira Farmacologia Hospitalar** v.2, p.15-20, 2004.

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

PALMA, H.E., WOLKMER, P., GALLIO, M. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Mol Cell Biochem**, 386: 199, 2014.

PEREIRA, RICARDO APARECIDO. **Efeitos do tratamento do extrato metanólico de *Baccharis dracunculifolia* sobre alterações bioquímicas e histológicas de um modelo animal de diabetes**. 2014, 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Etiology of Insulin Resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 5A, p. 105-165, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 6ª ed. 2007.

REYNA NY, CANO C, BERMÚDEZ VJ et al. Sweeteners and beta-glucans improve metabolic and anthropometrics variables in well controlled type 2 diabetic patients. **American Journal of Therapeutics** 10, 438-443, 2003.

RODRIGUES, ER, MORETI DLC, MARTINS CHG, KASAI A, STOPPA MA, ALVES EG, et al. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. [XI. *Chiococca alba* (L.) Hitchc]. **Rev Bras PI Med**;8:169-72. 32, 2006.

RUIZ-HERRERA, J. **Fungal cell wall: Structure, synthesis, and assembly**. Boca Raton, Ann Arbor, London: CRC press, 1956.

SALDANHA, R. L.; GARCIA, J. E.; DEKKER, R. F. H.; VILAS-BOAS, L. A.; BARBOSA, A. M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Braz J Microbiol**, v. 38:259–264, 2007.

SANTOS MRV, SOUZA VH, MENEZES IAC, BITENCURT JL, REZENDE-NETO JM, BARRETO AS, et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**;6:1-6, 2010.

SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLIK, S. K.; MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1287-1297, 2006.

SARIS WH. Glycemic carbohydrate and body weight regulation. **Nutr Rev**. ;61:S10–6, 2003.

SCHIMD, H.; NEUMANN, C.; BRUGNARA, L. O diabetes mellitus e a deservação dos membros inferiores: visão do diabetólogo. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.38-48, 2003.

SHAH, S.K.; WALKER, P.A.M.D.; MOORE-OLUFEMI, S.D.; SUNDARESAN, A.; KULKARNI, A.D.; ANDRASSY, R.J. An Evidence-Based Review of a *Lentinula edodes* Mushroom Extract as Complementary Therapy in the Surgical Oncology Patient. **J. Parenteral Enteral. Nutri.**, v.20, p. 1-10, 2011.

SHAHINIAN, S.; BUSSEY, H. b-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.35, n.3, p.477-489, 2000.

SILVA, M.; LIMA, W. G. L.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.55, n.1, p.46-53, 2011.

SILVA, V. de O. **Atividade anti-diabética de B-glucanos obtidos de *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb. (Poaceae), em ratos**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras.

SOLLA, J. J. S. P.; FRANCO, L. J. I.; CAMPOS, G. P.; MACHADO, C. A. O enfoque das políticas do SUS para a promoção da saúde e prevenção das DCNT: do passado ao futuro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 945-956, 2004.

SOLTANIAN, S.; STUYVEN, E.; COX, E.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates, **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, 109-138, 2009.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p. 61-68, 1945.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon source, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

STINEFELT B, LEONARD SS, BLEMINGS KP, SHI X, KLANDORF H. Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid. **Ann Clin Lab Sci**. 35(1):37-45, 2005.

SULLIVAN, R.; SMITH, J.E.; ROWAN, N.J. Medicinal mushroom and cancer therapy. **Spring**, v.49, p.159-170, 2006.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.41-46, 1998.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans, **Carbohydrate Polymers**, v. 92, 792-809, 2013.

TAPOLA N, KARVONEN H, NISKANEN L. Glycemic responses of oat bran products in type 2 diabetic patients. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**;15:255–61, 2005.

TELLES, C. B. S. **Análises estruturais e atividades biológicas de exopolissacarídeo extraído do fungo Pleurotus sabor-caju e de seu derivado sulfatado quimicamente**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal, 2010.

TSIOUFIS, D. CHATZIS, E. VEZALI, K. DIMITRIADIS, D. ANTONIADIS, A. ZERVOUDAKI, I., The controversial role of serum uric acid in essential hypertension: relationships with indices of target organ damage, **J. Hum. Hypertens**. 19, 211–217, 2005

TÚRMINA, Janaína Ângela. **Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo Lasiodiplodia theobromae MMPI**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; SILVA, M. L. C. Three exopolysaccharides of the b-(1-6)-D-glucan type and a b-(1-3;1-6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydr Res**. 343:2481–2485, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

VICKRAM, DATTAPRASAD D, THIRUMALARAO KR. Effect of thiopropanol on amino acid turnover and redox status in alloxan diabetic rat liver. **J. Evid. Based Med. Healthc**. 3(60), 3248-3251, 2016.

WHITEHEAD, I. JUNGNER, D. ROBINSON, W. KOLAR, A. PEARL, A. HALE, Serum urate, serum glucose and diabetes, **Ann. Clin. Biochem**. 29 (Pt 2),159–161, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Disease Surveillance**: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. p. 59, 1999.

YUN, S. Y.; KIM, S. P.; SONG, D. K. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on pancreatic beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v.541, p.115–121, 2006.