

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO CÓLON PROXIMAL DE RATOS DIABÉTICOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE *AGARICUS BLAZEI* MURRILL

Recebido em: 19/06/2023

Aceito em: 20/07/2023

DOI: 10.25110/arqsaude.v27i7.2023-023

Indyanara Inacio Barreto¹
Ana Paula de Santi Rampazzo²
Cristiano Massao Tashima³
Rosane Marina Peralta⁴
Adelar Bracht⁵
Maria Raquel Marçal Natali⁶
João Paulo Ferreira Schoffen⁷

RESUMO: O diabetes mellitus tipo I é resultado da absoluta deficiência de insulina, estando associado à anormalidades no metabolismo. Transtornos no trato gastrointestinal, tais como vômitos, disfagia e diarreia são frequentes no diabetes, sendo relacionados a alterações na morfologia intestinal e no sistema nervoso entérico. Compostos ricos em antioxidantes vem sendo utilizados como prevenção ou tratamento do diabetes. *Agaricus blazei* Murrill possui grande interesse farmacológico pelas propriedades anti-inflamatórias, hipoglicêmicas e antioxidantes. Neste trabalho, avaliamos a integridade estrutural da parede e inervação intrínseca do cólon proximal em modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina, tratados ou não com *A. blazei*. Ratos Wistar foram divididos em grupos: normoglicêmicos (N), diabéticos (D) e com suplementação (NB e DB) por gavagem do extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* (200mg/Kg), por 120 dias. Amostras do cólon proximal foram destinadas à técnicas histológicas para análise morfométrica da túnica mucosa, profundidade das criptas, muscular da mucosa, muscular externa e parede total, número de células caliciformes e avaliação morfoquantitativa da população mioentérica. O diabetes promoveu redução da muscular externa e muscular da mucosa com aumento na profundidade das criptas e área nuclear neuronal. O extrato promoveu hipertrofia da mucosa e muscular da mucosa. Houve manutenção na espessura da parede total, número de células caliciformes e na população neuronal mioentérica no diabetes e na suplementação. Conclui-se que o diabetes induzido por estreptozotocina e a suplementação com o extrato de *Agaricus blazei* causam ajustes morfológicos nas túnicas intestinais, sem interferir na parede e inervação mioentérica do cólon proximal,

¹ Mestra em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

E-mail: indyanara.barreto@hotmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8724-3299>

² Pós-Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: anapaulasant@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9153-6342>

³ Doutor em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP).

E-mail: cristianotashima@uenp.edu.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8054-9882>

⁴ Doutora em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá (UEM).

E-mail: rmperalta@uem.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5749-0723>

⁵ Doutor em Bioquímica. Universidade Estadual de Maringá (UEM). E-mail: abracht@uem.br

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8098-5705>

⁶ Doutora em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá (UEM).

E-mail: mrmnatali@uem.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7486-2581>

⁷ Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP).

E-mail: jpschoffen@uenp.edu.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9159-7313>

preservando a morfofisiologia absorptiva e motora deste segmento.

PALAVRAS-CHAVE: Cogumelo do Sol; Diabetes; Morfologia Intestinal; Células Caliciformes; Neurônios Mioentéricos.

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE PROXIMAL COLON OF DIABETIC RATS SUPPLEMENTED WITH *AGARICUS BLAZEI* MURRILL EXTRACT

ABSTRACT: Type I diabetes mellitus is a result of absolute insulin deficiency and is associated with abnormalities in metabolism. Disorders in the gastrointestinal tract, such as vomiting, dysphagia and diarrhea are common in diabetes, being related to changes in intestinal morphology and enteric nervous system. Antioxidant rich compounds have been used as prevention or treatment of diabetes. *Agaricus blazei* Murrill is highly pharmacologically interested in anti-inflammatory, hypoglycemic and antioxidant properties. In this work, we evaluated the structural integrity of the wall and intrinsic innervation of the proximal colon in an experimental model of streptozotocin-induced diabetes, treated or not with *A. blazei* Wistar rats were divided into groups: normoglycemic (N), diabetic (D) and supplementation (NB and DB) by gavage of the hydroalcoholic extract of *Agaricus blazei* (200mg / kg) for 120 days. Samples of the proximal colon were used for histological techniques for morphometric analysis of the mucosa, depth of the crypts, muscularis mucosa, external muscular and total wall, number of goblet cells and morpho-quantitative evaluation of the myenteric population. Diabetes promoted reduction of muscularis mucosa and external muscular with increased depth of the crypts and nuclear neuronal area. The extract promoted mucosa and muscular of the mucosa hypertrophy. There were maintenance of total wall thickness, number of goblet cells and in the myenteric neuronal population in diabetes and supplementation. It is concluded that streptozotocin-induced diabetes and supplementation with *Agaricus blazei* extract cause morphological adjustments in the intestinal tunica, without interfering with the wall and myenteric innervation of the proximal colon, preserving the absorptive and motor morphophysiology of this segment.

KEYWORDS: Cogumelo do Sol; Diabetes; Intestinal Morphology; Goblet Cells; Myenteric Neurons.

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL COLON PROXIMAL DE RATAS DIABÉTICAS SUPLEMENTADAS CON EXTRACTO DE *AGARICUS BLAZEI* MURRILL

RESUMEN: La diabetes mellitus tipo I es el resultado de la deficiencia absoluta de insulina y se asocia con anomalías en el metabolismo. Los trastornos del tracto gastrointestinal, como vómitos, disfagia y diarrea son frecuentes en la diabetes, estando relacionados con cambios en la morfología intestinal y en el sistema nervioso entérico. Los compuestos ricos en antioxidantes se han utilizado como prevención o tratamiento de la diabetes. *Agaricus blazei* Murrill está muy interesado farmacológicamente en propiedades antiinflamatorias, hipoglucémicas y antioxidantes. En este trabajo, se evaluó la integridad estructural de la pared e inervación intrínseca del colon proximal en un modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina, tratada o no con ratas *A. blazei* Wistar, divididas en grupos: normoglucémico (N), diabético (D) y suplementación (NB y DB) por sonda del extracto hidroalcohólico de *Agaricus blazei* (200mg/kg) por 120 días. Se utilizaron muestras del colon proximal para técnicas histológicas de análisis morfométrico de la mucosa, profundidad de las criptas, mucosa muscular, pared externa

muscular y total, número de células caliciformes y evaluación morfo-cuantitativa de la población mientérica. La diabetes promovió la reducción de la muscular de la mucosa y de la muscular externa con el aumento de la profundidad de las criptas y del área neuronal nuclear. El extracto promovió la hipertrofia mucosa y muscular de la mucosa. Hubo mantenimiento del espesor total de la pared, número de células caliciformes y en la población neuronal mientérica en diabetes y suplementación. Se concluye que la diabetes inducida por estreptozotocina y la suplementación con extracto de *Agaricus blazei* causan ajustes morfológicos en la túnica intestinal, sin interferir con la pared e inervación mientérica del colon proximal, conservando la morfofisiología absortiva y motora de este segmento.

PALABRAS CLAVE: Cogumelo do Sol; Diabetes; Morfología Intestinal; Células Caliciformes; Neuronas Mientéricas.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) tipo I possui origem autoimune ou idiopática, em que há destruição das células β pancreáticas resultando na absoluta deficiência de insulina, e aumento das concentrações de glicose sanguínea circulante, associados com anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (OLIVEIRA; VENCIO, 2016). Atualmente, o DM tipo I atinge 8,4 milhões de pessoas em todo o mundo, e a estimativa é que em 2040 este número aumente para 13,5-17,4 milhões (GREGORY et al., 2022). Entre as complicações sistêmicas destacam-se doenças cardiovasculares, insuficiência renal, anemia e infecções (OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

Algumas hipóteses já foram descritas acerca dos mecanismos moleculares induzidos por hiperglicemia, sendo a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) considerada a de maior relevância para as complicações da patologia (BROWNLEE, 2001). Este fenômeno ocorre pela formação de ligações cruzadas da glicose com proteínas, formando AGEs, que interferem com as funções proteicas (SINGH et al., 2014). Outra alteração induzida por este processo é a autooxidação, na qual os açúcares reduzem a molécula de oxigênio, resultando em intermediários como O_2^- , H_2O_2 e $\bullet OH$ e α -cetoaldeídos, que induzem danos em biomoléculas (ELGAWISH et al., 1996).

Transtornos no trato gastrointestinal (TGI) são frequentes em portadores de DM, e os sintomas relatados incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, disfagia, regurgitação, azia, constipação e diarreia (RODRIGUES; MOTTA, 2012). Esses sintomas estão relacionados à alterações na morfologia intestinal de indivíduos diabéticos, em que alguns estudos constataram aumento na espessura da parede total, altura dos vilos, túnica mucosa e profundidade de criptas no jejuno (ZHAO; YANG; GREGERSEN, 2003; DA ROSA et

al., 2015). Alterações no sistema nervoso entérico (SNE) também são observados no DM, como redução na densidade neuronal mioentérica jejunal (FREITAS et al., 2008).

A utilização de compostos nutritivos e ricos em antioxidantes para a prevenção e/ou tratamento do diabetes são frequentemente relatados (FERREIRA; BELÉM; ODA, 2015). Dentre estes, destaca-se o ácido ascórbico (FREITAS et al., 2008), L-glutamina (PEREIRA et al., 2016), vitamina E (ROLDI et al., 2009) e quercetina (LOPES et al., 2012) que demonstraram efeitos benéficos sobre a morfologia intestinal, profundidade de criptas e inervação intrínseca intestinal.

Estudos com basidiomicetos superiores, principalmente da espécie *Agaricus blazei* Murrill (ABM), demonstra propriedades anti-cancerígenas, anti-inflamatórias, hipoglicemiante, antioxidante (GUTERREZ et al., 2004; WU et al., 2014), anti-lipidêmico e anti-arteriosclerótica (KIM et al., 2005), além de ser fonte de carboidratos, proteínas, minerais e fibras (SHIBATA; DEMIATE, 2003). Em modelo experimental de diabetes induzido foi constatado que ABM ou suas frações suprime aumentos da glicemia em jejum e da hemoglobina glicada, recupera a perda de peso, aumenta os níveis séricos de insulina, reduz a produção de superperóxido, melhora a massa de células β -pancreáticas (NIWA; TAJIRI; HIGASHINO, 2011) e eleva a relação de eficiência alimentar (KIM et al., 2005).

Pesquisas indicam potencial benéfico e promissor do extrato de *Agaricus blazei* sobre o trato gastrointestinal. Segundo Santi-Rampazzo et al. (2015), a administração de extrato aquoso de *A. blazei* impediu a morte neuronal e das células gliais mioentéricas no jejuno durante o processo de envelhecimento em ratos Wistar. Resultados obtidos por Ferreira (2016) demonstram que o tratamento com extrato de ABM está associado a maior capacidade absorptiva do jejuno, maximizando os parâmetros morfométricos da parede total, túnica mucosa e altura de vilos em ratos diabéticos. A ausência de trabalhos que investigam a ação do ABM sobre a morfologia e sobre a inervação intrínseca mioentérica do intestino grosso em animais diabéticos aliada as propriedades farmacológicas já descritas para o ABM, justificam este estudo.

Desta forma, temos como objetivos avaliar os efeitos do diabetes (DM tipo I) induzido por estreptozotocina e do tratamento com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murrill sobre parâmetros morfoquantitativos da parede e dos neurônios mioentéricos do cólon proximal de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico e Metodologia de Extração Hidroalcoólica

Os basidiomicetos de *A. blazei* desidratados foram adquiridos de um produtor de Ibema - PR, Brasil (25°6'50"Sul, 53°0'53"Oeste), com padrão comercial classificado como grau A. Foram triturados até que se convertessem a pó fino, acondicionado em sacos de polietileno de alta densidade, hermeticamente fechados, e assim armazenados em temperatura ambiente na ausência de luz, e com sílica gel para controle da umidade.

Posteriormente foram então submetidos à extração hidroalcoólica de acordo com Oliveira et al. (2010), sendo adicionado um volume de 1000ml de etanol 70% a cada 100g do pó armazenado do basidiomiceto, solução esta que foi mantida sob agitação (130 rpm) por 3 horas, em temperatura ambiente. Os sólidos residuais foram removidos através de filtração, em papel filtro Whatman nº1, à vácuo e submetido a duas novas extrações, totalizando três processos. Posteriormente, o filtrado resultante foi rotavaporizado, liofilizado e conservado em freezer -20°.

2.2 Animais, Indução do Diabetes e Tratamento

Neste estudo foram utilizados 20 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, os quais a partir dos 90 dias de idade, foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM), em caixas de polipropileno, com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura de 22 ± 2 °C. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5): ratos normoglicêmicos (N), diabéticos (D), normoglicêmicos tratados com extrato hidroalcoólico de *A. blazei* (NB) e diabéticos tratados com extrato hidroalcoólico de *A. blazei* (DB).

O diabetes mellitus foi induzido nos grupos D e DB por meio de injeção endovenosa de estreptozotocina (STZ, 45mg/Kg de peso corporal; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em tampão citrato, pH 4.5 (10 mM) aos 90 dias de idade, após jejum de 10 horas. Para confirmação do estado diabético, a glicemia foi determinada (em jejum de 10 horas) 4 dias após a indução, através de coleta de sangue caudal e dosagem por glicosímetro (tiras de dosagem OptiumXceed Point Of Care). Animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL foram considerados diabéticos (LAPSHINA et al., 2006).

Todos os grupos receberam água e ração padrão para roedores ad libitum durante

o período experimental. Foi avaliada a média da ingestão alimentar (em gramas) e de líquidos (em mililitros) mensalmente, pela subtração entre a quantidade oferecida diariamente e as sobras na gaiola. A evolução da massa corporal (em gramas), ocorreu semanalmente. Os grupos NB e DB receberam diariamente, via gavagem, extrato hidroalcolólico de *A. blazei* na concentração de 200mg/Kg de peso corporal, durante 120 dias, enquanto os grupos N e D receberam 0,5 mL de água.

2.3 Coleta de Tecidos

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico-Thionembutal® (45 mg/kg, via endovenosa), e realizada coleta de sangue por punção cardíaca para dosagem glicêmica. Logo após, foi injetada uma dose letal do anestésico (100 mg/kg, via intraperitoneal) para a realização de laparotomia mediana e coleta e fixação do intestino grosso. Amostras do cólon proximal foram destinadas à processamento histológico para análise morfométrica da parede intestinal e determinação do número de células caliciformes, e à técnica de Giemsa para estudo morfoquantitativo dos neurônios mioentéricos. O processamento e análise das amostras foi realizado na Universidade Estadual do Norte do Paraná/Campus Luiz Meneghel.

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo N° 042/2014).

2.4 Processamento Histológico

Amostras do cólon proximal foram abertas na borda mesocólica, lavadas com solução salina, fixadas em Bouin por 6 horas, armazenados em álcool 70%, desidratadas posteriormente em séries de concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados com 6 e 5 µm de espessura em micrótomo rotativo.

2.5 Morfologia e Análise Morfométrica da Parede Intestinal

Cortes de 6 µm foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (H.E.) para a avaliação morfológica e morfométrica da parede colônica. Foram mensurados 100 pontos da parede total (PT), túnica mucosa (TM), muscular da mucosa (MMU), túnica muscular externa (TME) e a profundidade das criptas (PC) orientadas longitudinalmente em 12

cortes histológicos/animal, a partir de imagens capturadas em objetiva de 10X em microscópio de luz Zeiss Axio Scope.A1® acoplado com câmera AxioCam ERc5s®, e analisados com o software Image-Pro Plus® 4.5, sendo os resultados expressos em μm .

2.6 Histoquímica e Análise Quantitativa de Células Caliciformes

Cortes de 5 μm foram submetidos à técnica histoquímica com o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para evidenciar as células caliciformes produtoras de mucinas neutras. A quantificação da população de células caliciformes foi realizada com auxílio do software Image-Pro Plus® 4.5, em 50 imagens microscópicas por animal capturadas em microscópio de luz Zeiss Axio Scope.A1® acoplado com câmera AxioCam ERc5s®, em objetiva de 40X.

2.7 Evidenciação dos Neurônios do Plexo Mioentérico

A população total dos neurônios mioentéricos do cólon proximal foi evidenciada pelo método de coloração de Giemsa, à base de azul de metileno (BARBOSA, 1978). Para realizar a coloração, as amostras coletadas foram lavadas em solução salina 0,9% e, posteriormente, armazenadas em fixador de Giemsa. Após a fixação, preparados totais da túnica muscular foram obtidos através da remoção das túnicas mucosa, submucosa e túnica muscular circular de amostras do cólon proximal, por meio de dissecação sob estereomicroscópio com trans-iluminação. Os preparados de membrana obtidos foram corados por 24 horas pelo método de Giemsa em tampão fosfato de Sorensen 0,1N (pH 6.9), à temperatura ambiente e protegidos da luz. Posteriormente, foram desidratados em séries de concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética Permount®, sendo mantidos sob pressão de um peso metálico durante 5 dias para evitar a formação de bolhas de ar.

2.8 Análise Morfoquantitativa Neuronal

Para a quantificação da população neuronal mioentérica, foram realizadas contagens dos corpos celulares neuronais em 50 gânglios por animal/preparado de membrana, em imagens microscópicas capturadas nas regiões intermediária e antimesocólica da circunferência intestinal (25 imagens/região), utilizando objetiva de 40X.

Para a análise morfométrica neuronal, a partir das imagens capturadas, foi

realizada a mensuração da área (μm^2) de corpos celulares e núcleos de 100 neurônios/animal (50 neurônios/núcleos/região) do cólon proximal de cada animal, perfazendo um total de 500 células/núcleos por grupo. A área do citoplasma foi estimada pela subtração da área do núcleo da área do perfil do corpo celular.

A captura de imagens dos gânglios mioentéricos foi efetuada em microscópio de luz Zeiss Axio Scope.A1® acoplado com câmera AxioCam ERc5s®, e a análise morfoquantitativa realizada com auxílio do software de análise de imagem Image-Pro Plus® 4.5 – Media Cybernetics.

2.9 Análise Estatística

Os dados numéricos obtidos foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov para a verificação da normalidade, através do software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Todos os dados foram paramétricos. Os dados foram analisados utilizando-se do teste de Análise de Variância (one-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey, com os resultados expressos como média \pm erro-padrão, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

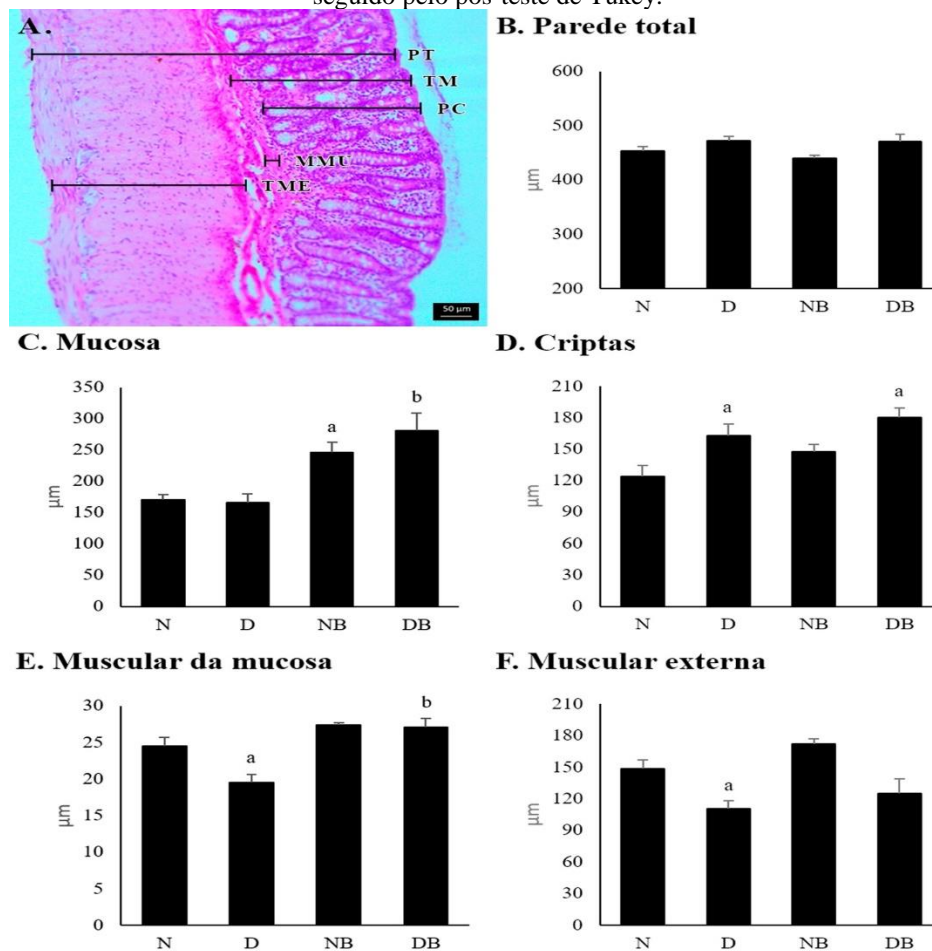
3. RESULTADOS

A partir dos cortes histológicos corados com H.E., verificou-se as características morfológicas típicas na organização do cólon proximal, independentemente do grupo experimental (Fig.1A). A túnica mucosa se caracterizava pela presença de pregas e criptas longitudinais regulares revestidas por epitélio do tipo simples cilíndrico, sendo evidenciados enterócitos, células caliciformes e células fonte. A tela submucosa apresentou-se reduzida com intensa vascularização e presença de gânglios submucosos. A túnica muscular externa estava organizada em estrato circular interno e estrato longitudinal externo de músculo liso e entre estas, havia a presença dos gânglios mioentéricos, sendo a parede intestinal finalizada por uma serosa típica.

Na análise morfométrica intestinal, constatou-se manutenção na espessura da parede colônica em todos os grupos de estudo (Fig.1B), apesar de observadas variações em algumas túnicas intestinais. O diabetes não alterou a espessura da túnica mucosa ($p > 0,05$), porém aumentou ($p < 0,05$) a profundidade das criptas e reduziu ($p < 0,05$) a camada muscular da mucosa quando comparado aos animais normoglicêmicos (Fig.1C-E). O tratamento com *A. blazei* promoveu hipertrofia da túnica mucosa nos grupos DB e

NB (Fig.1C), aumentando significativamente a espessura da muscular da mucosa no grupo diabético tratado (Fig.1E). Não se constatou efeito do *A. blazei* sobre a profundidade das criptas (Fig.1D). Houve atrofia da túnica muscular externa nos animais diabéticos em relação aos controles, todavia sem nenhum efeito do extrato hidroalcoólico sobre este parâmetro (Fig.1F).

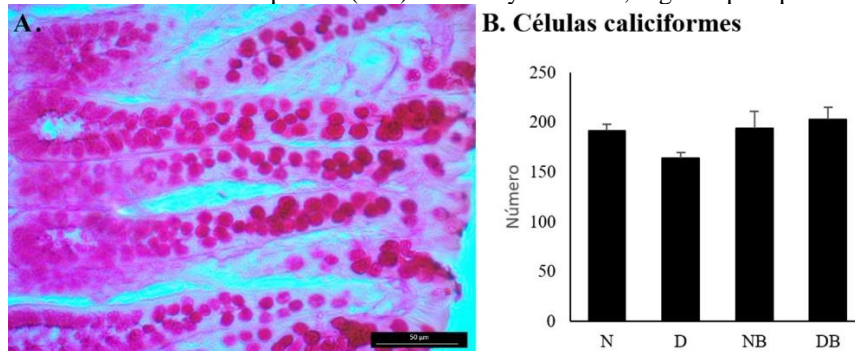
Figura 1 - Fotomicrografia do cólon proximal (A) evidenciando a parede total (PT), túnica mucosa (TM), profundidade das criptas (PC), muscular da mucosa (MMU) e túnica muscular externa (TME). Coloração: H.E. (Ampliação total: 100X). Médias morfométricas (μm) da parede total (B) túnica mucosa (C), profundidade das criptas (D), muscular da mucosa (E) e muscular externa (F) do cólon proximal de ratos normoglicêmicos (N), diabéticos (D) e tratados com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* (NB e DB). As barras representam a média \pm erro padrão (n=5). ^a Indica diferença estatística significante ($p < 0,05$) com o grupo N, e b indica diferença estatística significante ($p < 0,05$) com o grupo D. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Com relação a população de células calciformes produtoras de mucinas neutras (P.A.S.), o padrão de distribuição destas células presentes nas criptas intestinais foi semelhante entre os grupos (Fig.2A), não apresentando diferença estatisticamente significativa no número de células (Fig.2B).

Figura 2 - Fotomicrografia da mucosa colônica (A) com células caliciformes (em vermelho) evidenciadas pela técnica histoquímica do P.A.S. (Ampliação total: 400X). Número médio de células caliciformes (B) na túnica mucosa do cólon proximal de ratos normoglicêmicos (N), diabéticos (D) e tratados com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* (NB e DB). Dados sem diferença estatística significativa ($p>0,05$). As barras representam a média \pm erro padrão ($n=5$). One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Na análise morfoquantitativa mioentérica realizada a partir de preparados de membrana corados pelo método de Giemsa, o número de neurônios por gânglio e as áreas dos corpos celulares e do citoplasma neuronal não revelaram alterações significativas no diabetes ou no tratamento com *A. blazei*. Contudo, aumento ($p<0,05$) no tamanho nuclear foi constatado no grupo diabético em comparação ao grupo normoglicêmico (Tabela 1).

Tabela 1 - Número médio de neurônios mioentéricos por gânglio e áreas (μm^2) do corpo celular, núcleo e citoplasma neuronal no cólon proximal de ratos normoglicêmicos (N), diabéticos (D) e tratados com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* (NB e DB). Resultados expressos como média \pm erro padrão ($n=5$).

	N	D	NB	DB
Neurônios/gânglio	20,24 \pm 1,27	20,88 \pm 0,42	20,88 \pm 0,18	21,71 \pm 0,48
Corpo celular (μm^2)	280,00 \pm 11,86	315,00 \pm 5,82	281,40 \pm 6,34	315,00 \pm 10,64
Núcleo (μm^2)	112,00 \pm 3,32	127,50 \pm 3,02 ^a	115,80 \pm 2,90	124,80 \pm 2,24 ^a
Citoplasma (μm^2)	168,00 \pm 8,77	187,60 \pm 4,86	165,60 \pm 3,76	190,20 \pm 8,93

^a Indica diferença estatística significativa ($p<0,05$) com o grupo N. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

4. DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros Fisiológicos

O estabelecimento do modelo e estado nutricional dos animais foi realizado preliminarmente no Laboratório de Histotécnica Animal da UEM. O modelo de diabetes foi comprovado com elevação da glicemia, redução da massa corporal e peso de gorduras e aumento do consumo de ração e água. *Agaricus blazei* reduziu a ingestão de alimento e líquido dos animais diabéticos mas sem influência sobre a glicemia e o peso das gorduras, acentuando a redução de massa corporal (FERREIRA, 2016). Considerando que *A. blazei* é rico em carboidratos e proteínas, justifica-se a redução na ingestão alimentar com

repercussão sobre o consumo de líquidos dos ratos diabéticos tratados (OLIVEIRA et al., 1999).

4.2 Morfologia e Morfometria do cólon Proximal

A parede do cólon proximal é constituída morfologicamente por quatro túnicas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (SCHOFFEN et al., 2014). A mucosa é a camada mais interna (em contato direto com o lúmen) responsável por grande parte da absorção, proteção bacteriana através da produção de muco e degradação de carboidratos complexos e proteínas não digeridas através da fermentação, sendo esta túnica constituída de subcamadas, com um epitélio glandular que forma estruturas cilíndricas denominadas criptas, lâmina própria e presença de uma camada muscular (ZHAO; LIAO; ZHAO, 2017). Neste estudo o padrão de organização morfológica e espessura da parede total intestinal foram mantidas em todos os grupos, porém, as características morfométricas de algumas túnicas analisadas indicaram diferenças significativas.

O diabetes não foi capaz de alterar significativamente a espessura da túnica mucosa, mas aumentou a profundidade das criptas (31,45%) e reduziu em 20,34% a camada muscular da mucosa. Nossos resultados divergem de estudos realizados em outros segmentos do intestino delgado (CHEN; ZHAO; GREGERSEN, 2012; DA ROSA et al., 2015), nos quais a hipertrofia da mucosa intestinal com aumento na profundidade das criptas induzido pelo diabetes, porém, para o cólon proximal, a manutenção em espessura da túnica mucosa é um achado comum no diabetes crônico (TASHIMA et al., 2007; ROLDI et al., 2009), demonstrando manutenção funcional da mucosa colônica, apesar dos ajustes morfológicos ocorridos em seus elementos.

Chen, Zhao e Gregersen et al. (2012) observaram relação entre o acúmulo de produtos de glicação final (AGEs) e seus receptores (RAGE) ao aumento na espessura de diferentes túnicas (mucosa, submucosa, músculo circular e longitudinal) da parede jejunal e ileal, porém, nas túnicas do cólon, em que AGEs não foram observados, não houve aumento em espessura, fato que corrobora com nossos resultados. Estudos realizados em outros tecidos observaram indução de hipertrofia através do fator do crescimento do tecido conjuntivo (matriz extracelular renal) (ZHOU; LI; CAI, 2004), fator de crescimento endotelial vascular (retina) (MURATA et al., 1997) e interação entre AGE e RAGE (miofibroblasto renal) (OLDFIELD et al., 2001), os quais poderiam, por vias similares, agir como indutores da proliferação nos tecidos do intestino delgado. Vale

destacar que, hipertrofia na túnica mucosa está relacionado a redução na capacidade absorptiva intestinal durante a hiperglicemia (D'ADDIO et al., 2015) e que o diabetes afeta diferentemente os intestinos, com o intestino delgado sendo mais susceptível do que o intestino grosso (BELAI et al., 1991).

Tashima et al. (2007), utilizando modelo de diabetes crônico com o mesmo período experimental do nosso trabalho, não verificou alterações significativas no índice metafásico das células e na profundidade das criptas na mucosa do cólon proximal, ocorrendo possivelmente uma adaptação fisiológica frente a condição patológica induzida. O aumento na profundidade das criptas observada em animais diabéticos de nossa pesquisa, diverge dos resultados encontrados por Tashima e colaboradores (2007), o qual acreditamos ter ocorrido devido a maior concentração de estreptozotocina utilizada por nós para indução do diabetes (45 mg/kg) quando comparado a dose utilizada por estes autores (35 mg/kg).

O aumento na profundidade das criptas também pode estar relacionado ao maior consumo de ração e de água encontrado no grupo diabético, uma vez que estes fatores contribuem para a hiperplasia das células da mucosa (SANTI-RAMPAZZO et al., 2015), ou ainda, poderia relacionar-se ao maior índice proliferativo das células fonte, resultado também evidenciado em outros estudos (FREITAS et al., 2008; DA ROSA et al., 2015). Com relação a atrofia observada na muscular da mucosa, isto pode ter ocorrido a fim de se obter aminoácidos para síntese de proteínas nas células proliferativas e/ou hiperplásicas nas criptas intestinais. Contudo, inferimos que nenhum prejuízo absorptivo tenha ocorrido, já que a integridade da mucosa foi preservada semelhante à dos animais normoglicêmicos.

Contrariamente ao diabetes, o extrato hidroalcoólico de *A. blazei* causou hipertrofia (44,23% e 68,91% respectivamente) da túnica mucosa no grupos tratados (NB e DB) e aumentou na ordem de 38,95% a muscular da mucosa no grupo DB, sem interferir no tamanho das criptas quando comparado D a DB. Possivelmente as necessidades nutricionais dos animais diabéticos tratados, sinalizado pelo menor peso corporal e menor consumo de ração e água, levaram a necessidade de maior aproveitamento dos nutrientes presentes no extrato de *A. blazei* (COUTINHO; GENTIL; TORAL, et al., 2008) Desta forma, o tratamento aumentou significativamente a túnica mucosa e a camada muscular da mucosa como um ajuste para melhorar a absorção de nutrientes da dieta. Maior efluxo de aminoácidos exógenos podem também ter contribuído para aumento da síntese

proteica nestes estratos, aumentando assim suas espessuras. Ressalte-se que o extrato de ABM é rico em aminoácidos e proteínas (KIM et al., 2009; SOARES et al., 2013).

Com relação a túnica muscular externa, constatamos atrofia ($p < 0,05$) nesta camada (25,65%) nos animais diabéticos em relação aos controles. Atrofia na musculatura lisa intestinal já foi observada no cólon proximal (ROLDI et al., 2009) e no jejuno (FERREIRA et al., 2016) de ratos induzidos ao diabetes crônico. A privação de insulina inibe a síntese de proteínas na mucosa intestinal, tornando os aminoácidos circulantes mais facilmente disponíveis para a síntese de proteínas essenciais (CHARLTON; AHLMAN; NAIR, 2000), assim, a deficiência insulínica no diabetes crônico pode ter atenuado a síntese proteica tanto na muscular externa quanto na muscular da mucosa, contribuindo deste modo para sua redução. Deste modo, este processo pode disponibilizar aminoácidos como fonte energética e aumentar a possibilidade de produção de proteínas indispensáveis para homeostase do organismo. O tratamento com *Agaricus blazei* não provocou efeitos sobre este componente da parede.

4.3 População de Células Caliciformes

As células caliciformes presentes nas criptas, possuem função de secreção de mucinas, que recobre o epitélio intestinal, formando a primeira linha de defesa da mucosa colônica. Elas variam em número ao longo dos diferentes segmentos intestinais, sofrendo aumento gradual em direção às porções finais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Após a secreção, as mucinas hidratam a superfície do epitélio, gerando uma camada de muco que contém entre outros, água, eletrólitos e imunoglobulinas, que constituem uma barreira física e química protegendo o epitélio de agentes presentes no lúmen como bactérias, toxinas ambientais e compostos ingeridos que podem causar danos à integridade da camada (SPECIAN; OLIVER, 1991). Redução quantitativa dessas células pode diminuir a espessura da camada de muco protetora do epitélio e aumentar chances de infecção do órgão (SANTI-RAMPAZZO et al., 2015). No diabetes foi observado redução destas células no jejuno (FERREIRA, 2016), resultado também constatado em outras condições, como no envelhecimento e na restrição alimentar de roedores (SANTI-RAMPAZZO et al., 2015; BELÉM et al., 2015).

Neste trabalho não se verificou alterações significativas quanto ao número de células caliciformes ao longo das criptas intestinais em nenhum dos grupos. No íleo e no cólon proximal de ratos com diabetes crônico este resultado também já foi observado

(ROLDI et al., 2009; TRONCHINI et al., 2013), com aumento na profundidade das criptas (TRONCHINI et al., 2013) no grupo diabético. Contrariamente, Ferreira (2016) verificou redução na quantidade destas células no jejuno do grupo D e restauração de seu número com *A. blazei*. Isto nos permite inferir que o diabetes e o extrato hidroalcoólico de ABM não interferem na quantidade de células caliciformes e/ou na produção de mucinas das porções finais do trato digestório, desta forma, garantindo proteção à mucosa colônica.

Ettarh e Carr (1997) sugerem que o aumento no número de células caliciformes está diretamente relacionado com o aumento da túnica mucosa. Mesmo demonstrando modificações morfométricas na profundidade das criptas e no tamanho da camada muscular da mucosa, nossos resultados demonstram que a túnica mucosa do cólon proximal foi preservada em sua espessura quando comparamos os grupos N x D e NB x DB, assim justificando a manutenção nesta população celular como uma adaptação morfofuncional a condição de diabetes crônico.

4.4 Inervação Intrínseca Intestinal

Pacientes portadores de DM, pelo comprometimento do tubo digestório com danos ao sistema nervoso entérico, podem apresentar distúrbios específicos de motilidade, sendo alguns de grande relevância clínica como gastroparesia diabética, constipação e diarreia (CHANDRASEKHARAN et al., 2011). A hiperglicemia a longo prazo induz formação e acumulação dos AGEs, que ocasionam glicação miélnica, levando à secreção de proteases por macrófagos e promove susceptibilidade dos axônios à fagocitose, desempenhando importante papel na neuropatia diabética. Esta caracterizada por desmielinização segmentar e degeneração axonal dos neurônios periféricos, junto à anormalidades funcionais como redução da condução nervosa e fluxo sanguíneo (AHMED, 2005), diminuição dos fatores tróficos (BROWNLEE et al., 2001), com consequente redução da população neuronal entérica (ROLDI et al., 2009; CHANDRASEKHARAN et al., 2011; TRONCHINI et al., 2013).

Redução no número de neurônios mioentéricos em animais diabéticos comparado aos normoglicêmicos é um resultado frequente e esperado em diferentes segmentos do trato gastrointestinal utilizando-se variadas técnicas de evidênciação neuronal (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996; BUTTOW; MIRANDA-NETO; BAZOTTE, 1997; ZANONI et al., 1997; HERNANDES et al., 2000; FURLAN;

MOLINARI; MIRANDA NETO, 2002; ZANONI et al., 2002; ZANONI et al., 2003; TASHIMA et al., 2007). Entretanto, neste estudo não foram observadas alterações significativas quanto a densidade da população neuronal mioentérica do cólon proximal entre os grupos de estudo, o que demonstra nenhum efeito do diabetes ou do *A. blazei* sobre o número de neurônios mioentéricos (população geral) corados pelo Método de Giemsa.

A perda de neurônios induzida pelo diabetes no cólon proximal de ratos já foi constatada por Tashima et al. (2007), Zanoni, Pereira e Freitas (2007), Roldi et al. (2009), no entanto, ressalte-se que nestes trabalhos a contagem das células nervosas foi realizada por área intestinal, o que resulta em uma diluição na concentração de neurônios por área analisada, uma vez que aumento na dimensão do órgão em animais diabéticos é frequentemente relatado na literatura para ambos, intestino delgado (BELAI et al., 1991; ZHAO; YANG; GREGERSEN, 2003; BHOR; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2004) e intestino grosso (BELAI et al., 1991; ROLDI et al., 2009). Em nossa pesquisa, como efetivamos a contagem dos neurônios por gânglio mioentérico e não por área intestinal, podemos dizer que o nosso resultado não teve interferência pelo aumento intestinal. Dessa forma, confirmamos que não houve redução no número de neurônios mioentéricos no cólon proximal dos animais deste estudo.

Com relação a análise morfométrica neuronal, as áreas dos corpos celulares e do citoplasma das células nervosas não diferiram estatisticamente no diabetes ou no tratamento com *A. blazei*. Entretanto, ao comparamos o grupo D com o grupo N, constatou-se hipertrofia nuclear nos animais diabéticos. Manutenção no perfil celular neuronal foi observado no cólon proximal de ratos (TASHIMA et al., 2007; ZANONI; PEREIRA; FREITAS, 2007; ROLDI et al., 2009), sendo, portanto, um achado comum no intestino grosso de animais com esta patologia induzida.

O aumento no tamanho nuclear dos neurônios (13,84%) devido ao diabetes, indica aumento de síntese proteica neuronal compensando um possível prejuízo na transmissão neuromuscular, podendo estar associado a atrofia constatada na túnica muscular externa, uma vez que a redução deste parâmetro pode conduzir à desnervação intrínseca, já que o tecido muscular é inervado pelos neurônios entéricos (FREITAS et al., 2008; DA ROSA et al., 2015). Estas alterações podem estar relacionadas também à depleção das células intersticiais de Cajal no plexo mioentérico e musculatura lisa, que retransmitem informações dos neurônios entéricos para as células da musculatura lisa (RODRIGUES;

MOTTA, 2012), sendo um achado comum no diabetes mellitus (TOTH; MARTINEZ; ZOCHODNE, 2007). Não houve efeitos do ABM sobre os parâmetros morfométricos neuronais avaliados, não sendo capaz de reverter a hipertrofia nuclear observada com o diabetes.

Os diferentes segmentos intestinais possuem um comportamento distinto dependendo do quadro diabético imposto e também frente a resposta tecidual com o promissor tratamento com ABM. Pesquisar a administração do extrato de ABM considerando as diferentes formas de extração e concentrações é necessária. Assim como, a análise das subpopulações neuronais mioentéricas, fator que pode ser considerado uma limitação deste estudo, deve ser objeto de investigações futuras.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o diabetes induzido por estreptozotocina e a suplementação com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murrill (200mg/Kg) causam ajustes morfológicos nas túnicas intestinais, sem interferir na espessura da parede total, no número de células caliciformes e na população de neurônios mioentéricos do cólon proximal de ratos Wistar, desta forma, preservando a morfofisiologia absorptiva e motora deste segmento intestinal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UEM, a UENP, a Fundação Araucária e aos colaboradores do Laboratório de Morfologia Animal e Microscopia.

REFERÊNCIAS

- AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.
- BARBOSA, A.J.A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.**, v. 11, n. 2-3, p. 95-97, 1978.
- BELAI, A. et al. Differential effect of streptozotocin-induced diabetes on the innervation of the ileum and distal colon. **Gastroenterology**, v. 100, n. 4, p. 1024-1032, 1991.
- BELÉM, M.O. et al. Intestinal morphology adjustments caused by dietary restriction improves the nutritional status during the aging process of rats. **Exp. Gerontol.**, v. 69, p. 85-93, 2015.
- BHOR, V.M.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 1, p. 89-97, 2004.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.
- BUTTOW, N.C.; MIRANDA-NETO, M.H.; BAZOTTE, R.B. Morphological and quantitative study of myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 34, n. 1, p. 34-42, 1997.
- CHANDRASEKHARAN, B. et al. Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, n 2, p. 131-138, 2011.
- CHARLTON, M.; AHLMAN, B.; NAIR, K.S. The effect of insulin on human small intestinal mucosal protein synthesis. **Gastroenterology**, v. 118, n. 2, p. 299-306, 2000.
- CHEN, P.; ZHAO, J.; GREGERSEN, H. Up-regulated expression of advanced glycation end-products and their receptor in the small intestine and colon of diabetic rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2012.
- COUTINHO, J.G.; GENTIL, P.C.; TORAL, N. Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. S332-340, 2008.
- DA ROSA, C.V.D. et al. Supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine changes biochemical parameters and jejunum morphophysiology in type 1 diabetic Wistar rats. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. 1-16, 2015.
- D'ADDIO, F. et al. Circulating IGF-I and IGFBP3 levels control human colonic stem cell function and are disrupted in diabetic enteropathy. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 4, p. 486-498, 2015.
- ELGAWISH, A. et al. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 22, p. 12964-12971, 1996.

ETTARH, R.R.; CARR, K.E. A morphological study of the enteric mucosal epithelium in the streptozotocin-diabetic mouse. **Life Sci.**, v. 61, n. 18, p. 1851-1858, 1997.

FERREIRA, P.E.B.; BELÉM, M.O.; ODA, J.Y. O efeito do uso de antioxidantes na prevenção e tratamento da neuropatia diabética no sistema nervoso entérico. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 115-123, maio/ago. 2015.

FERREIRA, T.V. **Componentes sanguíneos e parâmetros morfológicos do jejuno de ratos diabéticos tratados com extrato hidroalcoólico de *Agaricus blazei* Murrill.** 2016. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

FREITAS, P. et al. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 42, p. 6518-6524, 2008.

FURLAN, M.M.D.P.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA NETO, M.H. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, n. 3A, p. 576-581, 2002.

GREGORY, G.A. et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, v. 10, n. 10, p. 741-760, 2022.

GUTERREZ, Z.R. et al. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, n.3, p. 301-309, 2004.

HERNANDES, L. et al.. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 58, n. 4, p. 1035-1039, 2000.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. **Histologia básica: texto e atlas.** (13^a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

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

LAPSHINA, E.A. et al. Antioxidative enzyme and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment. **Life Sci.**, v. 79, n. 19, p. 1804-1818, 2006.

LIU, M. et al. The anti-diabetic activity of oat beta-d-glucan in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 91, p. 1170-1176, 2016.

LOPES, C.R. et al. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 57, n. 12, p. 3106-3115, 2012.

MURATA, T. et al. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. **Diabetologia**, v. 40, n. 7, p. 764-769, 1997.

NIWA, A.; TAJIRI, T.; HIGASHINO, H. Ipomoea batatas and Agaricus blazei ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potential in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 48, n. 3, p. 194-202, 2011.

OLDFIELD, M.D. et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 12, p. 1853-1863, 2001.

OLIVEIRA, A.L. et al. Purinergic effects of a hydroalcoholic *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) extract on liver functions. **J. Agric. Food Chem.**, 58, n. 12, p. 7202-7210, 2010.

OLIVEIRA, E.C.M. et al. Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). **Alfenas**, v. 5, p. 169-172, 1999.

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

PEREIRA, R.V. et al. Differential effects in CGRPergic, nitrgergic, and VIPergicmyenteric innervation in diabetic rats supplemented with 2% L-glutamine. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 88, n. 1, p. 609-22, 2016.

RODRIGUES, M.L.C.; MOTTA, M.E.F.A. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. **J. Pediatr.**, v. 88, n. 1, p. 17-24, 2012.

ROLDI, L.P. et al. Vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation in diabetic rats: effects on the proximal colon. **BMC Gastroenterol.**, v. 9, p. 88., 2009.

ROMANO., E.B.; MIRANDA-NETO, M.H.; CARDOSO, R.C.S. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Rev. Chil. Anat.**, v. 14, n. 2, p. 139-145, 1996.

SANTI-RAMPAZZO, A.P. et al. Aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill prevents age-related changes in the myenteric plexus of the jejunum in rats. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

SCHOFFEN, J.P.F. et al. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 86, n. 4, p. 1833-1848, 2014.

SHIBATA, C.K.R.; DEMIATE, I.M. Cultivo e análise da composição química de cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril). **Ci. Biol. Saúde**, v. 9, n. 2, p. 21-32, 2003.

SINGH, V.P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J. Physiol. Pharmacol.**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2014.

SOARES, A.A. et al. Effects of an *Agaricus blazei* aqueous extract pretreatment on paracetamol-induced brain and liver injury in rats. **Bio. Med. Res. Int.**, v. 25, p. 1-12, 2013.

SPECIAN, R.D.; OLIVER, M.G. Functional biology of intestinal goblet cells. **Am. J.**

Physiol. Renal. Physiol., v. 260, n. 2, p. 183-193, 1991.

TASHIMA, C.M. et al. Diabetic rats supplemented with L-glutamine: a study of immunoreactive myosin-V myenteric neurons and the proximal colonic mucosa. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52, n. 5, p. 1233-1241, 2007.

TOTH, C.; MARTINEZ, J.; ZOCHODNE, D.W. RAGE, diabetes, and the nervous system. **Curr. Mol. Med.**, v. 7, n. 8, p. 766-776, 2007.

TRONCHINI, E.A. et al. Effect of l-glutamine on myenteric neuron and of the mucous of the ileum of diabetic rats. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 85, n. 3, p. 1165-1176, 2013.

WU, S. et al. Drying effects on the antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Agaricus blazei* Murrill. **Carbohydr. Polym.**, v. 103, p. 414-417, 2014.

ZANONI, J.N. et al. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. **Auton. Neurosci.**, v. 2003, n. 1, p. 32-38, 2003.

ZANONI, J.N. et al. M.H. Terminal ileum submucous plexus: study of VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, n. 1, p. 32-37, 2002.

ZANONI, J.N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.

ZANONI, J.N.; PEREIRA, R.V.F.; FREITAS, P. Effect of the ascorbic acid treatment on the nadhd-positive myenteric neurons of diabetic rats proximal colon. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 50, n. 1, p. 31-38, 2007.

ZHAO, J.; YANG, J.; GREGERSEN, H. Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats. **Diabetologia**, v. 46, n. 12, p. 1688-1697, 2003.

ZHAO, M.; LIAO, D.; ZHAO, J. Diabetes-induced mechanophysiological changes in the small intestine and colon. **World J. Diabetes**, v. 8, n. 6, p. 249-269, 2017.

ZHOU, G.; LI, C.; CAI, L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. **Am. J. Pathol.**, v. 165, n.10, p. 2033-2043, 2004.