UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo em ratos Wistar expostos ao exopolissacarídeo lasiodiplodana

Michela Bianchi de Mello

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo em ratos Wistar expostos ao exopolissacarídeo lasiodiplodana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientada: Michela Bianchi de Mello
Orientadora: Profa. Maria de Lourdes Pires Bianchi.

Ribeirão Preto
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mello, Michela Bianchi de.
Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo em ratos Wistar expostos ao exopolissacarídeo lasiodiplodana. Ribeirão Preto, 2015.
57 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Bianchi, Maria de Lourdes Pires.

1. Lasiodiplodana. 2.Beta-glucana. 3.Ensaio do Cometa. 4.Teste do Micronúcleo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michela Bianchi de Mello

Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo em ratos Wistar expostos ao exopolissacarídeo lasiodiplodana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Maria de Lourdes Pires Bianchi.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Delmar e Nurimar,

que sempre me impulsionam à ir em frente,

apoiaram-me em todos os momentos,

e não só foram minha base,

como me deram forças para que

eu construísse meus próprios alicerces.

Ao meu irmão, Máikel,

por ser um grande amigo

e sempre me dar motivos para sorrir.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais Núri e Delma, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos, e sempre acreditaram em mim;

Á minha mãe Núri, em especial, por sempre fazer das minhas necessidades, suas prioridades; pelos conselhos e lições das quais ajudaram a construir meu caráter, e também por me ensinar a sempre persistir.

Ao meu pai Delma, em por sempre me apoiar no alcance dos meus objetivos, pelos mimos, pela atenção e por sempre ser um exemplo inexplicável do que é ser pai.

Ao meu irmão Máikel, pelo apoio e carinho, mesmo à distância, pelos risos e por sempre estar ao meu lado.

À minha orientadora, Profª Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi, querida Dilu, pelos ensinamentos, exemplo profissional que muito contribuíram para a minha formação acadêmica, e pela dedicação no decorrer destes dois anos de orientação. Agradeço por ter confiado no meu trabalho, na minha capacidade científica e acima de tudo por sua amizade.

À Profª Dra. Lusânia Antunes, por transmitir seu conhecimento com dedicação, demonstrando sempre seriedade e amor pela pesquisa.

Aos funcionários do laboratório de Nutrigenômica, Joana Darin, Regislaine Valéria Burin e Jefferson Colognotto, pelo suporte técnico e pela amizade durante o período de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Alexandre Aissa, Bruno Franco, Carla Machado, Diego Ribeiro, Fábio Villa, Farah Chequer, Lívia Hernandes, Mara Almeida, Patrick Santos, Tarsila Gomes, Vinícius Venâncio, pela contribuição na realização deste projeto, e pela companhia sempre agradável durante os longos dias de trabalho.

À Carla Machado e Lívia Hernandes, por todos os risos fáceis que tive com vocês no laboratório e fora dele. À Carla por ser uma companhia de domingo, e de idas e vindas da Faculdade, os dias passavam mais rápido quando estava contigo. À Lívia, que mesmo com as nossas tentativas fracassadas de nos tornarmos bailarinas, tu provou que é uma guerreira e vencedora, e hoje não só é exemplo profissional como exemplo de vida!

Ao Vinícius Venâncio, por todos os momentos que se dispôs a me ajudar. Por insistir nas atividades físicas, e me apresentar à corrida.

Ao Diego Ribeiro, por se tornar um grande amigo mesmo no pequeno período de convivência, por toda ajuda que me deste mesmo distante.

À República Colmeia, que me acolheu como se fosse uma abelha Rainha, fizeram-me sentir ter uma família, mesmo estando a 1200 km de casa. Por todos os risos, surpresas e diversão que tive ao lado de vocês. Obrigada por tornarem esse período da minha vida mais fácil e divertido. Em especial à Amanda Testa e Laís Barion, por me incluírem nas suas vidas e de suas famílias, por serem minhas confidentes, amigas, apoio em todos os momentos nestes últimos 2 anos.

À um companheiro de todas as horas de estudo, de domingos de manhã, de momentos que eu precisei de foco, e que fazia eu me sentir mais perto de casa, ao chimarrão.

À Andriele Focking, que independente da distância, nunca deixou de fazer parte da minha vida e de todos os momentos que passei para chegar até aqui.

À Taís Fiorentin, minha colega de faculdade, de IC, por quem tenho um imenso carinho, e que dividiu comigo muito finais de semana solitários em longas conversas online.

Aos animais de experimentação deste projeto, os ratos, que deram suas vidas para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), que me acolheram com tanto carinho no estágio curricular e na pós-graduação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FCFRPUSP, pela infraestrutura.

À Deus, que tudo proporcionou.

RESUMO

MELLO, M. B. **Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo em ratos Wistar expostos ao exopolissacarídeo lasiodiplodana, 2015.** 57f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A lasiodiplodana é uma β-(1→6)-D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* (MMPI). Algumas das atividades biológicas desse exopolissacarídeo foram relatadas, como sua ação hipoglicêmica, anticoagulante e antiproliferativa, entretanto, seus efeitos sobre a instabilidade cromossômica e modulação do estresse oxidativo ainda não foram demonstrados. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos, antigenotóxicos e a modulação do estresse oxidativo do exopolissacarídeo lasiodiplodana em ratos Wistar. Também foram avaliados a variação da massa corpórea, peso relativo dos órgãos e consumo de ração após tratamento com a lasiodiplodana. Ratos Wistar machos receberam água ou solução de lasiodiplodana por gavagem durante 14 dias consecutivos e foram divididos em 8 grupos: grupo controle negativo, em que os animais foram tratados com água; grupo lasiodiplodana, que foi tratado com três diferentes doses (5, 10 ou 20 mg/kg de massa corpórea) da β-glucana associada ou não com o antitumoral doxorrubicina (DXR); e o grupo controle positivo que recebeu água via gavagem e ao 14º dia o antitumoral DXR intraperitoneal. Os resultados obtidos com o ensaio do cometa não demonstraram diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos controle negativo e os grupos lasiodiplodana em todas as doses avaliadas. Quando a lasiodiplodana foi associada com a DXR houve diferença significativa ($p>0,05$) em comparação ao grupo DXR, sendo que as três doses testadas da lasiodiplodana foram capazes de reduzir a %DNA na cauda em células de fígado, rim, coração e sangue. O tratamento com a lasiodiplodana não aumentou significativamente a indução de micronúcleo (MN) e ainda foi eficaz na redução da frequência de MN em medula óssea e sangue periférico em todas as doses testadas. A lasiodiplodana foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em tecido cardíaco induzido pela DXR. A possível atividade antioxidante demonstrada pela lasiodiplodana pode ser a responsável pelo efeito positivo frente a danos à estrutura do DNA, caracterizado pelos efeitos antigenotóxico e antimutagênico observados. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que a lasiodiplodana não apresentou efeito genotóxico nem mutagênico e ainda apresentou efeitos protetores contra os danos induzidos no DNA.

Palavras-chave: *Lasiodiplodia theobromae* MMPI; β-(1→6)-D-glucana; exopolissacarídeo; ensaio do cometa; estresse oxidativo; teste do micronúcleo.

ABSTRACT

MELLO, M. B. **Genomic instability and oxidative stress evaluation in rats exposed to exopolysaccharide lasiodiplodan, 2015.** 57f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The lasiodiplodan is a β-(1→6)-D-glucan produced by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* (MMPI). Some of the biological activities of this exopolysaccharide were reported as hypoglycemic, anticoagulant and anti-proliferative action, however, its effects on chromosomal instability and modulation oxidative stress have not still been demonstrated. Thus, this study aimed to evaluate the genotoxic, antigenotoxic and modulation of oxidative stress lasiodiplodan exopolysaccharide effects in Wistar rats. The variation in body mass, relative weight of organs and feed intake after treatment with lasiodiplodan were also evaluated. Male Wistar rats received water or lasiodiplodan solution by gavage for 14 consecutive days and were divided into 8 groups: negative control group, the animals were treated with water; lasiodiplodan group, that was treated with three different doses (5, 10 or 20 mg/kg body weight) of β-glucan, associated or not associated with antitumor doxorubicin (DXR); and the positive control group that received water by gavage and the 14th day antitumor DXR intraperitoneal. The results of comet assay showed no significant differences ($p < 0.05$) between the lasiodiplodan groups in all evaluated doses and negative control. When lasiodiplodan associated with DXR was significant difference ($p > 0,05$) compared to DXR group, and the three tested doses of lasiodiplodan were able to reduce %DNA in tail at liver, kidney, heart and blood cells. Treatment with lasiodiplodan not significantly increased induction of micronuclei (MN) and was effective in reducing MN frequency in bone marrow and peripheral blood in all doses tested. The lasiodiplodan was capable reducing the lipid peroxidation induced in cardiac tissue by DXR. Potential antioxidant activity demonstrated by lasiodiplodan maybe responsible for positive effects observed front DNA structure damage, characterized by antigenotoxic and antimutagenic effects observed. According to the results obtained in this study, we can conclude that lasiodiplodan showed absence of genotoxic or mutagenic effects and have a protective effects against DNA damage.

Palavras-chave: *Lasiodiplodia theobromae* MMPI; β-(1→6)-D-glucan; exopolysaccharide; comet assay, oxidative stress, micronucleous test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da β-(1→6)-D-glucana.....5

Figura 2: Delineamento experimental 18

Figura 3: Fotomicrografia de nucleoide de sangue periférico 26

Figura 4: Porcentagem de DNA (% DNA) na cauda no ensaio cometa em células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos 28

Figura 5: *Tail* moment de nucleoides de células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar 28

Figura 6: Porcentagem de DNA (% DNA) na cauda no ensaio cometa em células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar ..29

Figura 7: *Tail* moment de nucleoides de células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar 30

Figura 8: Fotomicrografia de esfregaço de medula óssea de rato Wistar 24 horas após administração de doxorrubicina 33

Figura 9: Fotomicrografia mostrando um micronúcleo em reticulócito de sangue periférico de rato Wistar 24 horas após administração de doxorrubicina 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação de massa corpórea, e porcentagem da massa do fígado/massa corpórea, massa do rim/massa corpórea e massa do coração/massa corpórea, e consumo de ração de ratos Wistar 25

Tabela 2: Porcentagem de redução de DNA (% DNA) na cauda no ensaio cometa tecidos analisados de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com LS e 24 h após administração do antitumoral DXR (15 mg/kg p.c.)..... 31

Tabela 3: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados(MNPCE) e de reticulócitos micronucleados (MNRET) no sangue periférico, porcentagem de redução e relação PCE/NCE em células de medula óssea em ratos Wistar 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%DNA	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides
CAT	Catalase
CM-CG	Carboximetil Quitina-Glucana
CN	Grupo de animais tratados com o controle negativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa Reduzida
i.p.	Intraperitoneal
LS	Grupo de animais tratados com doses de lasiodiplodana
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrócitos policromáticos micronucleados
MNRET	Reticulócitos micronucleados
NCE	Eritrócito normocromático
nm	Nanômetro
OECD	Organization For Economic Co-Operation And Development
PCE	Eritrócitos policromáticos anucleados
p.c.	Peso corpóreo
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
TT	Tempo De Trombina
TTPA	Tempo De Tromboplastina Parcial Ativada

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de Figuras iii
Lista de Tabelas iv
Lista de Abreviaturas e Siglas v

1 INTRODUÇÃO 2

1.1 β-glucanas……2

1.2 e a Lasiodiplodana (β-(1→6)-D-glucana)..... 4

1.3 Toxicologia genética 6

1.4 Doxorrubicina (DXR)..... 8

1.5 Biomarcadores de danos oxidativos 9

2 OBJETIVOS DO PROJETO 12

2.1 Objetivos Gerais 13

2.2 Objetivos Específicos..... 13

4 MATERIAL E MÉTODOS 14

4.1 Reagentes……..15

4.2 Produção de Lasiodiplodana 15

4.3 Critérios de escolha da DXR como controle positivo 16

4.4 Tratamento dos animais 16

4.5 Ensaio do Cometa 18

4.6 Teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico 19

4.7 Análise das concentrações de GSH e TBARS em fígado, rim e coração de ratos..... 20

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 21

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES PRELIMINARES..... 22

6.1 Escolha das doses da lasiodiplodana……23

6.2 Variação de massa corpórea e consumo de ração..... 24

6.3 Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da lasiodiplodana.... 25

6.4 Investigação da atividade mutagênica e antimutagênica da lasiodiplodana em células de medula óssea e sangue periférico 32

6.5 Glutationa reduzida e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico 35

6.6 Considerações finais……39

7 CONCLUSÕES 40

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42

11 ANEXOS 57

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 β-glucanas

As β-glucanas de origem fúngica são descritas como polissacarídeos constituídos de unidades D-glicose, encontradas principalmente na parede celular, adjacente à membrana plasmática com a função de manter a forma e rigidez celulares (CUNHA et al., 2012). No ambiente natural em que os microrganismos são encontrados, tais polímeros podem estar relacionados à patogenicidade, ou associados à interação planta-microrganismo, proporcionando proteção à célula microbiana contra a dessecação ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários (BAUERMEISTER, 2010). Esses polissacarídeos representam a maior parte do peso seco da parede celular e compõem a carcaça esquelética responsável pelas características de estabilidade e morfologia celular (FARKAS, 1979; KOGAN et al., 2008).

Estes extratos de polissacarídeos obtidos de fungos são comumente vendidos como suplementos alimentares. O comércio destes compostos tem se tornado muito popular, principalmente onde as fontes de β-glucanas são conhecidas e consumidas há muitos anos (FINIMUNDY et al., 2013). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2008) definiu a redução da absorção de colesterol, e especifica que os produtos comercializados forneçam no mínimo 3g de β-glucana por porção do produto se o mesmo for sólido ou 1,5g se o produto for líquido. Devido as suas características reconhecidas, polissacarídeos provenientes de bactérias e fungos têm despertado interesse de indústrias químicas e farmacêuticas, e de diversos grupos de pesquisas em vários países (KAGIMURA et al., 2015).

Por vários séculos, produtos de origem natural vêm sendo pesquisados quanto à sua eficiência para a prevenção ou tratamento de diversas doenças (VETVICKA, 2011). Dentre as atividades biológicas das β-glucanas, a redução de danos oxidativos ao DNA induzido por H_2O_2, observada pelo ensaio do cometa em células de pulmão de hamster *in vitro* (V79), foi evidenciada por Slamenová et al. (2003) com duas formas derivadas da β-(1-3)-D-glucana, já em células da medula óssea de camundongos tratados com β-glucana, houve uma redução na frequência de micronúcleos (MN) em comparação aos animais tratados com o quimioterápico

mitomicina C em estudo realizado por Delaney et al. (2014). Como antitumoral *in vitro,* algumas β-glucanas derivadas de extratos aquosos de *L. edodes* e *P. sajor-caju*, apresentaram atividade inibindo o crescimento de linhagens celulares tumorais Hep2 e HeLa (FINIMUNDY et al., 2013).

Também já foram descritos *in vivo* efeitos imunoprotetores e antigenotóxicos da β-glucana CM-CG (carboximetil quitina-glucana), a qual foi estudada por meio de dieta enriquecida (200mg/kg p.c.) durante 21 dias em ratos, com avaliação pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo, demonstrando que os animais tratados foram eficientes em reduzir a %DNA na cauda e a % de células micronucleadas quando comparado ao pré-carcinógeno benzo[a]pireno em hepatócitos (LAZAROVÁ et al., 2009). Ainda foram verificados efeitos de outras β-glucanas como protetores contra infecções microbianas de alguns patógenos (NOVAK & VETVICKA, 2009), e estudos clínicos em humanos demonstraram, através da ingestão dessas substâncias, atividades imunoprotetoras (DEMIR et al., 2007; MAGNANI et al., 2011; MIKKELSEN et al., 2014). Em estudo realizado com a ingestão da β-(1,3)-(1,6)-glucana fúngica de *S. cerevisiae*, em indivíduos saudáveis, observou-se uma redução de 25% de gripe comum sintomática, quando comparado ao grupo placebo, além de não ser observado sinais de toxicidade aos seres humanos estudados (AUINGER et al. 2013).

Outra β-glucana isolada, botriosferana, isolada do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e estrutura caracterizada pela β(1→3; 1→6)-D-glucana, foi avaliada quanto aos seus efeitos mutagênicos e antimutagênicos *in vivo* utilizando um protocolo de tratamento subcrônico (15 dias). Esta β-glucana reduziu a frequência de micronúcleos em células da medula óssea e do sangue periférico de camundongos (MIRANDA et al., 2008). Outro estudo avaliando a ação das β-glucanas frente aos danos no DNA demonstrou que ratos diabéticos, quando tratados com extrato enriquecido por quatro semanas, apresentaram redução de danos ao DNA em fígado e rim (MIRJANA et al., 2013). Tais estudos apresentados demonstram que as β-glucanas possuem possível atividade promissora na proteção de danos causados ao DNA.

1.2 Lasiodiplodana (β-(1→6)-D-glucana)

A lasiodiplodana da β-(1→6)-D-glucana, produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, denominada lasiodiplodana, foi identificada por Vasconcelos et al. (2008). As colônias de *L. theobromae* variam de coloração acinzentada a negras, dependendo do substrato utilizado, com abundante micélio aéreo (RODRIGUES, 2003). *L. theobromae* é um fungo patogênico em plantas de regiões tropicais e subtropicais, conhecido principalmente por sua variedade em compostos bioativos (LIMA et al. 2012; TSUKADA et al. 2010). Para a produção do isolado da lasiodiplodana, pesquisadores utilizaram fontes de nitrogênio e carbono como o extrato de levedura e glicose, respectivamente. Este método é importante para tornar o isolamento do exopolissacarídeo mais rentável que outros tipos de extração, e também não há registros na literatura sobre tipos de fontes de carbono para a produção de lasiodiplodana (CUNHA et al., 2012).

Em estudo realizado com a lasiodiplodana foi demonstrado que este composto possui importante atividade hipoglicêmica em camundongos. Animais tratados com doses de 50 mg/kg p.c. desta glucana apresentaram redução de 35% nas concentrações de glicose no sangue, além disso, também foi observada a redução na atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransaminase quando comparados ao grupo controle (TÚRMINA et al., 2012).

Vasconcelos et al. (2013) demonstraram *in vitro* a atividade anticoagulante da lasiodiplodana sulfonada em concentrações encontradas no plasma humano por meio de ensaios clássicos de coagulação, tendo como padrão o anticoagulante heparina. Os autores observaram o aumento dose-dependente ~5 vezes maior do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), sugerindo a inibição da via intrínseca de coagulação, e também o aumento de ~7vezes maior do tempo de trombina (TT), indicando a inibição da formação de fibrina, em relação ao controle negativo. Cunha et al. (2012) avaliaram o efeito antiproliferativo da lasiodiplodana nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 1500 µg/mL em cultura de células MCF-7 de câncer da mama, e obtiveram um platô a partir da concentração de 100 µg/mL de lasiodiplodana.

Os efeitos biológicos das β-glucanas em geral variam dependendo de suas características estruturais, como por exemplo o peso molecular, a composição

química e a conformação das cadeias (WASSER et al., 2002). Acredita-se que a estrutura química das β-glucanas seja a responsável pelas atividades biológicas relacionadas com o controle das concentrações sanguíneas de biomarcadores para a obesidade, diabetes, síndrome metabólica, resposta ao tratamento de doenças infecciosas e atividade antitumoral (CHEN; SEVIOUR, 2007; EL KHOURY, 2012; STEVENSON, et al., 2012; BAE et al., 2013). A lasiodiplodana apresenta uma configuração estrutural em tripla hélice, representada na Figura 1. Os resultados de um estudo realizado com a β-glucana isolada a partir do fungo *Lentinula edodes*, com conformação em tripla hélice, demonstraram forte atividade antitumoral dessa glucana quando comparado à sua versão em cadeia simples, sendo que a porcentagem de inibição de proliferação celular da lentinan (inibição de 49,5%) com conformação em tripla hélice foi semelhante ao antitumoral 5-fluoracil (inibição de 50,5%), indicando que esta estrutura tem um papel importante na atividade antitumoral (ZHANG et al., 2005).

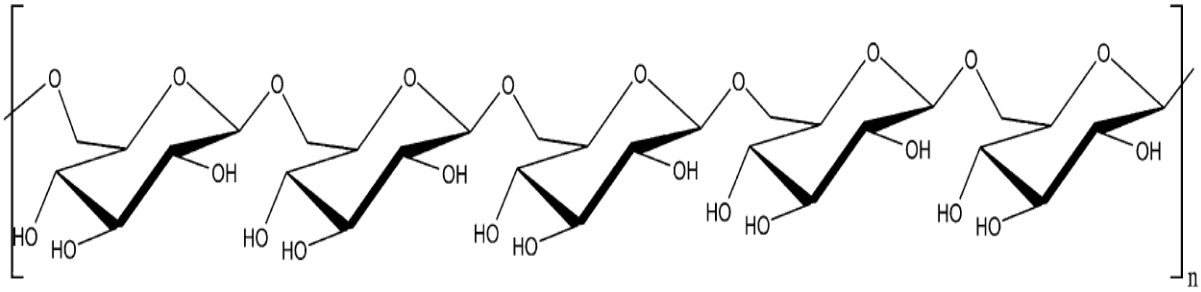

Figura 1: Estrutura da β-(1→6)-D-glucana. *Fonte: Vasconcelos et al. 2008*.

Existem poucos estudos relacionados à toxicidade da lasiodiplodana. Túrmina et al. (2012) avaliaram a toxicidade subcrônica em camundongos, analisando parâmetros bioquímicos, imunológicos e histopatológicos após o tratamento com este exopolissacarídeo, e não evidenciaram sinais de toxicidade nestes animais na dose 50 mg/kg por via oral, independente do sexo.

Segundo a OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*), para a determinação adequada da toxicidade de uma substância química é necessária a realização de experimentos que utilizem a via oral, empregando doses repetidas, a fim de fornecer informações sobre os possíveis danos à saúde que podem surgir a partir de uma exposição ao longo de um período de tempo relativamente limitado. A duração da exposição subcrônica à determinada

substância teste pode ser de 14 a 28 dias, dependendo das circunstâncias (OECD, 407).

1.3 Toxicologia genética

Mutagenicidade é o termo utilizado para se referir à indução de alterações permanentes na sequência de DNA em organismos vivos, que podem resultar ou em mudanças hereditárias relacionadas às características destes organismos ou então ao desenvolvimento de graves doenças, como por exemplo, o câncer (SŁOCZYŃSKA, et al., 2014). Já genotoxicidade é um termo mais amplo, e está relacionada ao efeito potencial de danos no material genético ou em componentes celulares responsáveis pela regulação da fidelidade do genoma (como topoisomerases, sistemas de reparo do DNA e DNA polimerases), porém ainda passíveis de correção (EASTMOND et al., 2009).

Para que sejam avaliados os efeitos genotóxicos e mutagênicos de uma determinada substância, existem metodologias padronizadas e internacionalmente aceitas por agências regulatórias, como o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo (MN) (SCHMID, 1975; SING, 1988; HOLDEN, MAJESKA & STUDWELL, 1997; TICE et al., 2000; FDA, 2012; ANVISA, 2013; LUZHNA et at., 2013). A "*International Conference on Harmonization"* (ICH - S2 (R1), 2012) propõe ainda que haja a combinação do ensaio cometa com o teste do micronúcleo (MN) *in vivo*.

Kang et al. (2013) afirmam que a combinação do ensaio do cometa e teste do MN, com suas diferenças individuais de sensibilidade e marcadores quantificáveis, desempenham papeis capazes de avaliar a genotoxicidade, da mesma maneira como avaliar a incidência de carcinogênese, sem a necessidade de utilizar animais experimentais adicionais. A associação destes dois ensaios tem sido empregada nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2010; SERPELONI et al., 2010; SERPELONI et al., 2011; AISSA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; HERNANDES et al., 2014)

Em toxicologia genética, o ensaio do cometa (*Single cell gel electrophoresis - SCGE assay*) é amplamente utilizado para detectar alterações no DNA ou danos

genotóxicos, ainda passíveis de reparo. Estes danos genotóxicos podem ou não ser fixados no DNA, resultando em uma mutação (WITTE et al., 2007). Os agentes que interagem com o DNA levando a alterações ou mesmo quebras na estrutura do DNA podem ser considerados genotóxicos (OBE et al., 2004). Esta metodologia além de apresentar alta sensibilidade na detecção de danos genotóxicos, também possui a vantagem da necessidade de pequeno número de células para a análise, bem como baixo custo e fácil execução (TICE et al., 2000).

Nos últimos 20 anos o ensaio do cometa vem sendo uma ferramenta valiosa na biomonitorização, para quantificar o dano ao DNA em populações expostas a vários tipos e doses de agentes genotóxicos, podendo contribuir para a “dosagem de efeito biológico” em exposições ocupacionais e ambientais (COLLINS et al., 2014). O ensaio do cometa possibilita a obtenção de uma estimativa recente sobre a integridade do DNA frente à agente genotóxicos e de estresse oxidativo (TAIOLI et al., 2002). Na nutrienômica, o ensaio do cometa é um indicadorA utilização do ensaio do cometa em animais inclui a aplicabilidade em vários tecidos, como coração, fígado, rim e cérebro (SMITH et al., 2008; VASQUES, 2012), sendo, inclusive, bastante empregada em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2010; SERPELONI et al., 2010; SERPELONI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; AISSA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2013; HERNANDES et al. 2014; CHEQUER et al., 2015).

Resumidamente, o ensaio do cometa é composto pelo processo de lise, o desenrolar do DNA, eletroforese, neutralização, fixação, coloração da lâmina do cometa, e análise de imagem (OECD 489, 2014). O ensaio baseia-se na deposição da suspensão de células em uma lâmina contendo agarose, e em seguida sua exposição em solução de lise utilizando detergente com alta concentração de cloreto de sódio, a qual proporciona que o DNA fique livre de membranas e histonas, chamado assim de nucleoide, que é então submetido à eletroforese. Após, fixadas e coradas, as lâminas são analisadas em microscopia de fluorescência. No trabalho realizado por Östling e Johanson (1984), sugere-se que o DNA é organizado em grandes estruturas supercoloidais, que, quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, podem migrar do polo negativo para o polo positivo, através da eletroforese (TICE et al., 2000; KLAUDE et al., 1996).

Entre os estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários para a liberação de novas substâncias recomendados pela ANVISA

(2013) e pela MutaGen (Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental), o teste do micronúcleo (MN) é empregado por diversos laboratórios de pesquisa. O teste do MN *in vivo* é capaz de detectar a presença de agentes clastogênicos (quebras de partes cromossômicas) e aneugênicos (perda de cromossomos inteiros), sendo internacionalmente aceito para a detecção de agentes mutagênicos (RIBEIRO et al., 2003).

O teste do MN é baseado na observação do efeito do agente testado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCE) de medula óssea ou em reticulócitos no sangue periférico, devido à facilidade de visualização do MN, o qual permanece no citoplasma dos eritrócitos imaturos (ou policromáticos) após a última divisão celular (SCHMID, 1975). Sendo assim, o aumento da frequência de micronúcleos representa dano cromossômico recente. Por serem facilmente identificáveis e terem distribuição bem definida, os micronúcleos permitem que os resultados obtidos forneçam fortes evidências da mutagenicidade do agente químico avaliado (RIBEIRO, 2003; HAYASHI et al., 2007). O aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE's) ou reticulócitos micronucleados (MNRET's) de roedores são indicativos da ocorrência de danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Para evidenciar o eventual efeito antigenotóxico e antimutagênico de uma substância, ou seja, a capacidade de uma substância em proteger danos ao DNA, é necessária a utilização de um agente indutor de danos ao material genético, sendo que os agentes antitumorais são frequentemente utilizados para esta função (SERPERLONI et al., 2010; FEDATO; MAISTRO, 2012; VENÂNCIO et al., 2012).

1.3 Doxorrubicina (DXR)

O antitumoral Doxorrubicina (DXR) foi isolado na década de 1960 (ARCAMONE et al., 1969) e demonstra ampla aplicabilidade terapêutica contra tumores sólidos e hematológicos (STERBA et al., 2013), sendo muito utilizado em diversos tratamentos quimioterápicos como agente antitumoral (VENKATESH et al., 2007). Este fármaco é bastante utilizado em ensaios de antigenotoxicidade e antimutagenicidade, como agente indutor de danos cromossômicos em células de

roedores *in vivo*, sendo empregado como controle positivo nestas investigações (RIBEIRO et al., 2010; FEDATO; MAISTRO, 2012; ATTIA et al., 2013).

Entre os mecanismos de ação responsáveis pela quebra da estrutura do DNA pela DXR, destacam-se: inserção de uma porção aglicona entre os pares de bases adjacentes do DNA, provocando quebras nas fitas do DNA; modificação da capacidade das helicases nucleares para separar a dupla hélice (MONTEIRO NETO et al., 2011); indução de ligações covalentes entre o DNA e a enzima topoisomerase II (VENKATESH et al., 2007), desestabilizando esta enzima e provocando danos ao DNA. A DXR também pode induzir a redução de elétrons, produzindo compostos que reagem com macromoléculas e lipídeos de membrana (INJAC; STRUKELJ, 2008), causando danos oxidativos nas células que podem provocar mutações e consequentemente o desenvolvimento de câncer (PAN; GHAI; HO, 2008).

1.4 Biomarcadores de danos oxidativos

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são derivadas de muitas fontes, e em geral são resultado de subprodutos do metabolismo oxidativo e têm uma ampla variedade de efeitos fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005; HO et al., 2013).

Quando células geram ERO em excesso, causam estresse oxidativo, que pode levar a um processo de promoção e progressão de carcinogênese (ZIECH et al., 2011). Vários antioxidantes atuam como defesa contra as EROs, sendo que o desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e o aumento da sua produção, tanto por via endógena quanto por via exógena, resultam na alteração do estado redox celular, que tem o potencial de causar danos aos componentes celulares (HALLIWELL et al., 2012).

Tem sido demonstrado que os níveis de ERO influenciam na expressão dos principais genes envolvidos na regulação celular e sistema de estresse oxidativo (HO et al., 2013). Os principais alvos de ERO incluem DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula (EVANS et al., 2004; BERRA et al., 2006).

Os biomarcadores de estresse oxidativo podem ser classificados como moléculas que interagem com ERO e sofrem alterações (HO et al., 2013). As alterações no estado redox das células podem ser: proliferação celular desordenada, aumento da síntese de defesas antioxidantes, senescência, apoptose, necrose e/ou dano celular. Alguns biomarcadores de estresse oxidativo são formas indiretas de detectar radicais livres, pois não detectam as espécies reativas, mas sim os danos causados por elas nos diferentes componentes das células, como lipídeos e proteínas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

O sistema antioxidante não-enzimático engloba os agentes capazes de reduzir os radicais livres via doação de elétrons, dentre eles, destacam-se a glutationa reduzida (GSH) (VASCONCELOS et al., 2007). O aumento da liberação de glutationa no organismo ocorre em função das mudanças no estado redox desta enzima, causadas pelo estresse oxidativo (ROVER Jr. et al., 2001). Na biotransformação e eliminação de xenobióticos, a glutationa (GSH) fornece um substrato para a glutationa peroxidase na redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Os níveis de GSH podem ser avaliados por meio da reação entre este tripeptídeo e o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), com a formação do ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) que é proporcional à quantidade inicial de GSH e pode ser quantificado por métodos fluorimétricos e espectrofotométricos (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009)

Já nas membranas celulares, ocorre um processo fisiológico contínuo e um fator de renovação da membrana, sendo fundamental na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, e também na fagocitose e na pinocitose, chamado lipoperoxidação (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). Porém, a peroxidação lipídica pode representar um evento citotóxico que desencadeia uma sequência de lesões celulares, sendo, assim, um indicador de processos deletérios que envolvem a participação de radicais livres (LIMA; ABDALLA, 2001). A quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é realizada por meio de metodologia para a avaliação da formação de compostos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* – TBARS). Este teste envolve a reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído (MDA), além de outros aldeídos e produtos de decomposição dos hidroperóxidos, que sob condições ácidas e de aquecimento, formam produtos de cor rosa quantificáveis por métodos colorimétricos e fluorimétricos (NIKI, 2014). O MDA é um produto da peroxidação lipídica (TSAI et al., 2015) e é quantificado

usando a metodologia de TBARS (JANERO et al., 1990).

Há na literatura diversos relatos sobre a atividade antioxidante das β-glucanas em geral (KOGAN et al., 2008; MAITY et al., 2014; NANDI et al., 2014; WANG et al., 2014). Tal atividade pode ser associada à conformação estrutural das β-glucanas, sugerindo que estas sejam capazes de doar elétrons, transformando espécies reativas em produtos estáveis e não reativos (MAITY et al., 2014).

As poucas investigações sobre a lasiodiplodana têm mostrado seus efeitos biológicos importantes, incluindo capacidade antiproliferativa em células MCF-7 de câncer de mama, efeito hipoglicemiante e ainda atividade anticoagulante (CUNHA et al., 2012; TÚRMINA et al, 2012; VASCONCELOS et al., 2013). As β-glucanas têm sido relacionadas à promoção da saúde, além disso, podem ter efeitos moduladores sobre os danos induzidos no DNA. Na literatura consultada não foram encontrados estudos relatados e sobre a toxicidade deste exopolissacarídeo fúngico, ou trabalhos que analisaram o possível efeito protetor frente a danos induzidos ao DNA. Assim, considerando as propriedades biológicas gerais das β-glucanas, a qual pode minimizar a instabilidade genômica e a geração de radicais livres, torna-se relevante o estudo dos efeitos da lasiodiplodana.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do isolado exopolissacarídeo lasiodiplodana, produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, bem como a sua influência sobre a modulação da peroxidação lipídica e glutationa reduzida. Adicionalmente, avaliar a capacidade protetora, sobre os danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina.

2.2 Objetivos Específicos

I. Avaliar a possível atividade genotóxica e antigenotóxica da lasiodiplodana em células de fígado, rim e coração de ratos Wistar;

II. Investigar os possíveis efeitos citotóxicos, mutagênicos e antimutagênicos da lasiodiplodana em medula óssea e sangue periférico de ratos;

III. Avaliar a influência do exopolissacarídeo lasiodiplodana na modulação da peroxidação lipídica e glutationa reduzida em ratos Wistar, associados ou não à DXR, em células hepáticas, renais e cardíacas.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Para ensaio cometa e o teste do micronúcleo, os reagentes utilizados foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Para a coloração das lâminas do ensaio do cometa foi utilizado o corante GelRED™ (Biotium, Hayward, California, Estados Unidos, CAS 67-68-5), e a coloração das lâminas do teste do micronúcleo foi realizada com os corante Giemsa (Sigma-Aldrich, CAS 51811-82-6) e Laranja de Acridina (Sigma-Aldrich, CAS 10127-02-3). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Produção de Lasiodiplodana

A produção da lasiodiplodana foi realizada pelo pesquisador Dr. Mário A. A. Cunha da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Paraná – Brasil, que gentilmente forneceu o exopolissacarídeo para a realização dos experimentos.

Foi utilizado o fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* isolado de Pinha *(Annona squamosa*). O exopolissacarídeo lasiodiplodana foi produzido por sistema descontínuo em biorreator de bancada (Biostat B, B. Braun International, Alemanha). O meio foi constituído com glicose como fonte de carbono (40 g/L), K_2HPO_4 (2 g/L) , $MgSO_4.7H_2O$ (2 g/L) e extrato de levedura (2 g/L). Foi empregado um volume de inóculo de 100 mL (CUNHA et al, 2012). O caldo fermentado contendo a lasiodiplodana foi separado da biomassa celular por centrifugação (1,500 × g/30 min), e o sobrenadante foi exaustivamente dialisado. Posteriormente, o exopolissacarídeo foi precipitado com quatro volumes de etanol, que foi recuperado por filtração em papel filtro, ressuspendido em água. No final do processo, foi obtida uma solução de lasiodiplodana purificada. A solução estoque de lasiodiplodana na concentração de 3,5 g/L em água foi preparada, autoclavada a 121°C por 20 min e empregada nos testes biológicos.

4.3 Critérios de escolha da DXR como controle positivo

A doxorrubicina foi escolhida como controle positivo por ser um agente genotóxico efetivo *in vivo* e *in vitro.* Em roedores, a DXR é capaz de induzir dano ao DNA em células de fígado, rim e sangue periférico (MONTEIRO et al., 2010; AISSA et al., 2012; ALMEIDA et al, 2013; HERNANDES et al., 2014), e alterar o estado redox celular (SEGREDO et al., 2013). Portanto, a DXR foi o fármaco de escolha como controle positivo nesse trabalho, sendo utilizada de forma isolada ou associada a diferentes doses de lasiodiplodana. A via de administração da DXR foi a intraperitoneal, 24 horas antes da realização da eutanásia, em única dose de 15 mg/kg p.c. A dose utilizada foi baseada em estudos onde a DXR se apresenta como eficiente agente genotóxico em avaliações pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo (ALMEIDA et al, 2012; ALMEIDA et al, 2013).

A DXR foi utilizada na forma de Cloridrato de Doxorrubicina, adquirida do Laboratório Eurofarma (São Paulo, SP, Brasil). A solução de DXR, na concentração de 2 mg/mL, foi preparada imediatamente antes das administrações, protegida da luz.

4.4 Tratamento dos animais

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob protocolo nº 13.1.218.53.1. Foram utilizados ratos machos (*rattus norvegicus)* da linhagem Wistar, pesando ±110 gramas, com 4 a 5 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos segundo os critérios para o cuidado e uso de animais de laboratório, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas/12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e alimentados com ração (Nuvilab®, Curitiba/PR, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos de tratamento, com 6 animais em cada grupo (*n*=6), para as determinações das atividades genotóxica, antigenotóxica, mutagênica, antimutagênica e de estresse oxidativo.

O tratamento foi realizado diariamente por 14 dias, com intervalos de 24 horas entre as administrações. No 14° dia de tratamento e 24 horas antes da eutanásia, os animais receberam por via intraperitoneal solução salina (NaCl 0,9%) ou DXR (15 mg/kg p.c.) (Figura 2). As doses da lasiodiplodana testadas foram: 5, 10 ou 20 mg/kg de peso corpóreo por dia. A solução de lasiodiplodana diluída em água foi administrada diretamente nos animais experimentais na quantidade necessária calculada por meio do peso dos mesmos, em um volume de até 1 mL. Os grupos de tratamento foram:

- Grupo Controle Negativo (CN): os animais receberam água destilada por gavagem (0,2 mL/100g p.c.) diariamente, seguida de solução salina fisiológica i.p (NaCl 0,9% - 0,5 mL/100g p.c) no 14º dia de tratamento;
- Grupo Controle Positivo (DXR): os animais receberam água destilada por gavagem (0,2 mL/100g p.c) diariamente, seguida do antitumoral DXR i.p (15mg/kg p.c. - 0,5 mL/100g p.c) no 14º dia de tratamento;
- Grupos lasiodiplodana (LS): os animais receberam solução de lasiodiplodana (5, 10 ou 20 mg/kg p.c.) por gavagem diariamente, seguida da solução salina i.p. (NaCl 0,9% - 0,5 mL/100g p. c.) no 14º dia de tratamento.
- Grupos lasiodiplodana + DXR (LS + DXR): os animais receberam soluções de lasiodiplodana (5, 10 ou 20 mg/kg p.c.) por gavagem, e em seguida DXR i.p. (15 mg/Kg p.c - 0,5 mL/100 g p.c.).

Ao fim do experimento, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg p.c., i.p.) e submetidos a eutanásia por decapitação. Em seguida foram coletados o fígado, os rins, o coração e uma alíquota de sangue da veia caudal para a realização do ensaio do cometa e teste do micronúcleo. Os órgãos foram pesados a fim de se estabelecer a relação de massa do órgão com a massa corpórea. Amostras de fígado, rim e coração de cada animal foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80ºC para dosagem de GSH e TBARS. Também foram removidos os fêmures dos animais para coleta das células da medula óssea e análise dos micronúcleos em PCE. Os animais foram pesados diariamente para cálculo da dose da substância-teste e para

detectar possíveis alterações na massa corpórea devido aos tratamentos administrados.

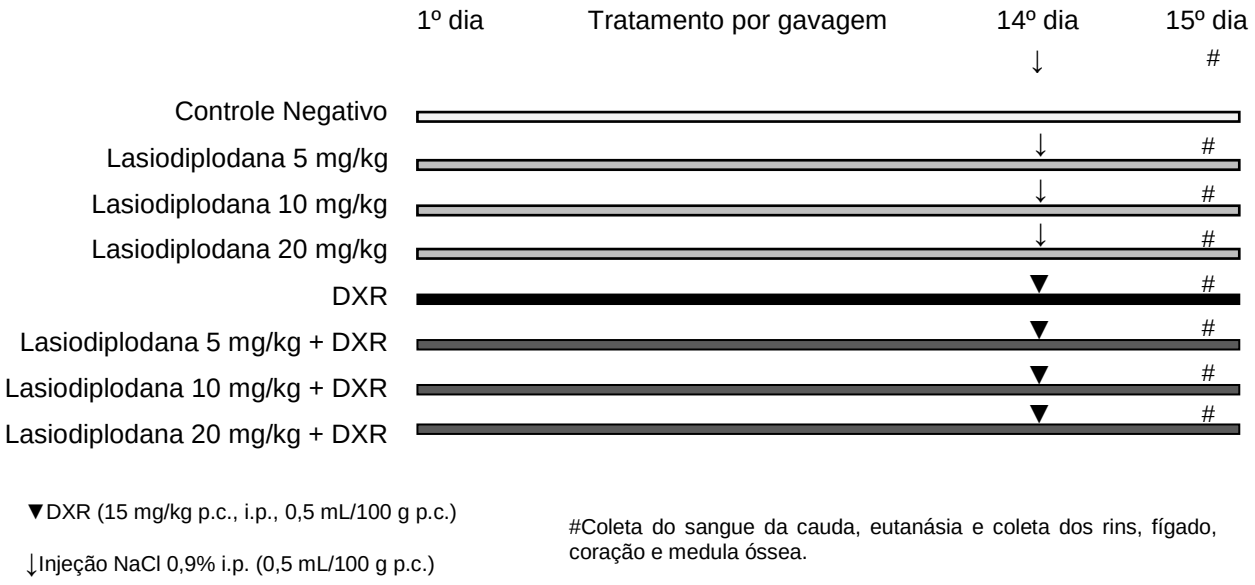

Figura 2: Delineamento experimental.

4.5 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado em células do fígado, rim, coração e sangue periférico conforme descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). As células isoladas do fígado, rim e coração foram obtidas após fragmentação mecânica em solução de Hanks, e o sangue periférico foi coletado da veia caudal usando o anticoagulante EDTA.

Para a realização do ensaio do cometa é necessária a avaliação da viabilidade celular, foi realizada usando o método de exclusão pelo azul de tripan, que se baseia na avaliação da integridade da membrana celular.

As suspensões celulares (80 µL) foram homogeneizadas em 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e em seguida depositadas em lâminas contendo agarose normal a 1,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As lâminas foram imersas em solução de lise celular (NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, DMSO 10%, Triton X-100 1% e Tris 10 mM, pH 10) por 24 horas e

em seguida foram transferidas para solução de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos, para favorecer a desnaturação do DNA. Posteriormente foram transferidas para cuba horizontal, onde foram submetidas à eletroforese (0,78 V/cm, 25V, 300mA, 20 minutos), neutralização (Tris–HCl 0,4 M, pH 7,5, 5 minutos) e secas ao ar. A fixação foi feita no dia posterior em etanol absoluto por 2 minutos.

A coloração foi feita imediatamente antes da análise, utilizando GelRed® 1:10.000 (v/v) (Biotium, Hayward, CA, EUA) e os nucleoides foram analisados em microscópio de fluorescência (AxioStar Plus, Carl Zeiss Axio Cam MRc - AxioVision 3.1) utilizando filtro 516-560nm, barreira de filtro de 590nm, e aumento de 200x. As imagens de 100 nucleóides aleatórios foram analisadas pelo sistema Comet Assay IV™, versão 4.3 (Perceptive Instruments, Reino Unido) pelo parâmetro *Tail Intensity* (% de DNA na cauda) e *Tail Moment* (intensidade de fluorescência na cauda, multiplicado pelas distâncias relativas do centro da cabeça do nucleoide, dividido pelo total da intensidade do cometa).

A porcentagem de redução da cauda do DNA em célula teciduais dos animais tratados com a lasiodiplodana associada à DXR foi calculada conforme Manoharam, Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), por meio da fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{Média do escore em A – Média do escore em B}}{\text{Média do escore em A – Média do escore em C}} \times 100$$

Onde A é o controle positivo DXR, B é o grupo tratado com lasiodiplodana e C é o grupo controle negativo.

4.6 Teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico

O teste de micronúcleo na medula óssea foi realizado como proposto por Schmid (1975), de modo que a medula óssea foi coletada dos fêmures com soro bovino fetal, a suspensão celular centrifugada (10 minutos a 900 rpm) e em seguida realizou-se um esfregaço do *pellet* em lâminas previamente limpas e secas. Após fixação em metanol absoluto, as lâminas foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão Sorensen (Na_2HPO_4 e $KHPO_4$, pH 6,8) na

proporção de 1 mL do corante para 20 mL da solução tampão, por 10 minutos. Foram analisados 2.000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal. Também foi realizada a relação entre eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) em 500 eritrócitos por animal, uma vez que é possível distinguir as células da medula óssea com a coloração Giemsa (pH 5,5) em função das diferentes fases de maturação em que estas se encontram, sendo que os eritrócitos jovens (PCE) apresentam coloração azul ou roxa e os eritrócitos maduros (NCE) podem ser visualizados em uma coloração rósea (HEDDLE et al., 2011).

O teste do micronúcleo em sangue periférico foi realizado como descrito por Holden, Majeska e Studwell (1997). O sangue foi coletado da veia caudal dos animais no 15º dia de tratamento, 24 horas após a injeção de salina ou DXR, e foi feito um esfregaço em lâminas previamente limpas. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto e foram coradas com laranja de acridina (CAS: 10127-02-3, Sigma-Aldrich) (18 µg/mL), imediatamente antes da análise. A análise citogenética foi realizada em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus) combinando luz azul (488nm) e filtro amarelo, objetiva de 40x. A frequência de micronúcleo foi analisada em 1000 reticulócitos por animal (HAYASHI et al., 1990).

A porcentagem de redução da frequência de micronúcleos em células de medula óssea e sangue periférico dos animais tratados com a lasiodiplodana associada à DXR foi calculada conforme Manoharam, Banerjee (1985) e Waters et al. (1990).

4.7 Análise das concentrações de GSH e TBARS no fígado, rim e coração de ratos

Para quantificação de GSH reduzida, 200 mg dos tecidos (fígado, rim ou coração) foram homogeneizados em 2 mL de solução de KCl 1,15% p/v, e em seguida diluídos em água (1:4), precipitados com TCA 50% e centrifugados a 2000g por 10 min (SEDLAK; LINDSAY, 1968), obtendo-se um sobrenadante. Em uma alíquota (0,5 mL) do sobrenadante foram adicionados 2,0 mL de tampão Tris-EDTA (0,2 M, pH 8,9) e 0,1 mL de DTNB [5,5´-ditiobis(2-nitrobenzóico].

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 412 nm e as concentrações de glutationa foram determinadas com o auxílio de uma curva padrão de α-cisteína nas concentrações de 0,10; 0,04; 0,02 e 0,01 µmol/mL, obtida pela mesma metodologia descrita acima. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Lowry com as amostras analisadas em 650 nm (HARTREE, 1972), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

As concentrações de TBARS foram determinadas nos tecidos hepático, renal e cardíaco de ratos de acordo com Draper & Hadley (1990). Uma alíquota de 200 µL do homogeneizado descrito acima foi adicionada em 500 µL da solução de reagente de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,8 % m/v), 500 µL de tampão ácido acético (pH 3,4) e 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS 8,1% m/v) e em seguida foi incubada por 2 horas em banho-maria à 95°C. As amostras foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro, a 532 nm, utilizando curva padrão com concentrações crescentes de malondialdeído (1,5 a 9,0 nmol/mL), seguindo o mesmo procedimento descrito para as amostras. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e analisados quanto à normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância pelo ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Dunnett. O programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado como ferramenta de análise. O valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os resultados avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Escolha das doses da lasiodiplodana

A escolha da via de administração é essencial nas avaliações toxicológicas, sendo a melhor via aquela que se assemelha a exposição habitual da substância (HARTMANN et al., 2003). A seleção das doses da substância teste também é um aspecto muito importante nos estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade. Conforme orientações de OECD, a dose limite para tratamento com doses múltiplas até 14 dias é de até 2000 mg/kg p.c. entre 24 horas (OECD,1997) ou até a dose mais solúvel (TICE et al., 2000). As doses de lasiodiplodana definidas neste estudo foram baseadas na máxima dose solúvel, referente a 20 mg/kg p.c.

Os isolados de diferentes β-glucanas possuem característica de difícil solubilidade em água, uma vez que suas propriedades no organismo fúngico se referem à rigidez e sustentação da parede celular (MIRA; GRAF; CÂNDIDO, 2009). Em alimentos ricos em β-glucanas, assim como em seus isolados, a alta viscosidade depende da solubilidade, concentração e peso molecular, e em concentrações superiores a 0,2% as moléculas de β-glucanas formam um emaranhado viscoso (ANTILLA et al., 2004). Uma vez que o volume de ingestão diária máxima recomendada pela OECD é de 10 mL/kg p.c., e que o isolado de lasiodiplodana apresentou-se viscoso, o volume administrado de maneira segura desta β-glucana em animais com peso inicial de 110 g e idade entre 4 a 5 semanas foi de 1 mL. A lasiodiplodana foi administrada na dose máxima de 20 mg/kg p.c. durante 14 dias consecutivos, observando aspectos clínicos evidentes de sobredose da substância testada (diarreia, alterações comportamentais, piloereção, convulsão ou morte). Nenhum efeito fisiológico citado foi observado com a dose de 20 mg/kg p. c. Portanto, esta dose foi escolhida como a maior dose a ser testada neste estudo. A fim de avaliar possíveis efeitos dose-dependente, foram também propostas doses de 10 mg/kg p.c. e 5 mg/kg p.c. de lasiodiplodana.

6.2 Variação de massa corpórea e consumo de ração

Os primeiros parâmetros avaliados nesse estudo foram a variação de massa corpórea (diferença entre a massa corpórea no início do tratamento e massa corpórea no último dia de tratamento) e a avaliação do peso relativo dos órgãos (expresso como porcentagem em relação à massa corporal). A comparação entre o peso de órgãos de animais de grupos tratados e controles é convencionalmente utilizada para predizer possíveis efeitos tóxicos quando há alterações entre os grupos. Utilizando esse parâmetro ainda é possível identificar prováveis órgãos-alvo da exposição (MICHAEL et al., 2007; SELLERS et al., 2007; WOLFSEGGER et al., 2009). A Sociedade de Patologia Toxicológica acredita que o peso dos órgãos têm valor em estudos em que os animais têm uma exposição sistêmica ao composto por, pelo menos, 7 dias (SELLERS et al., 2007). Por exemplo, a indústria farmacêutica julgou útil a utilização do peso do fígado pela sensibilidade desse órgão em predizer toxicidade, sendo um alvo frequente em estudos toxicológicos. Ainda a variabilidade do órgão de animal para animal é pequena e é considerado o principal órgão de desintoxicação (MICHAEL et al., 2007).

Aliado a estes parâmetros, foi avaliado nesse estudo o consumo de ração (média diária de consumo de ração por animal), estabelecendo a diferença entre a quantidade de ração fornecida e a quantidade de ração presente no dia seguinte. O acompanhamento do consumo de ração e água de animais nos permite obter um maior entendimento sobre os efeitos adversos da substância teste, permitindo ajustes no delineamento experimental e nas doses utilizadas (CHAPMAN et al., 2013).

Os resultados da variação da massa corpórea e do peso relativo dos órgãos, tanto do fígado quanto do rim e do coração, em todas as doses da lasiodiplodana, não demonstraram diferenças significativas em relação aos controles, o que pode predizer a ausência de macrolesões da lasiodiplodana nesses tecidos. O consumo de ração também não foi diferente entre os grupos de tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Variação de massa corpórea, e porcentagem da massa do fígado/massa corpórea, massa do rim/massa corpórea e massa do coração/massa corpórea, e consumo de ração de ratos Wistar tratados com diferentes doses de lasiodiplodana associadas ou não à doxorrubicina (15 mg/kg p.c. i.p.)

Dados referentes a 6 animais por grupo. Média ± desvio padrão CN: controle negativo; LS: β-glucana

Grupo	Ganho de massa corpórea (g)	Massa relativa do fígado(%)	Massa relativa dos rins(%)	Massa relativa do coração (%)	Consumo de ração (g/dia)
CN	158,30±30,66	5,90±1,4	2,04±0,32	0,60±0,11	29,64±2,2
LS 5mg/kg	177,24±30,78	5,65±1,5	1,19±0,06	0,50±0,11	28,10±2,9
LS 10mg/kg	163,24±33,09	5,71±2,0	1,21±0,03	0,48±0,08	29,14±1,7
LS 20mg/kg	150,66±40,44	5,66±1,9	1,36±0,12	0,54±0,20	30,46±1,4
DXR	153,54±20,67	6,36±0,8	2,26±1,84	0,55±0,14	27,20±1,9
LS 10mg/kg+DXR	120,60±14,26	8,50±2,9	4,05±2,38	0,70±0,27	22,82±1,4
LS 10mg/kg+DXR	109,62±13,26	6,80±0,5	3,49±2,33	0,65±0,10	31,57±2.4
LS 20mg/kg+DXR	111,00±34,59	7,30±1,1	3,69±2,54	0,64±0,16	24,46±1,6

lasiodiplodana; DXR: doxorrubicina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA, seguido de teste de Dunnett ($p>0,05$).

6.3 Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da lasiodiplodana

Inicialmente, o ensaio do cometa foi desenvolvido por Ostling & Johanson (1984) para detectar danos ao DNA em células de mamíferos induzidos por radiação. Há duas versões para o ensaio do cometa: a versão neutra e a versão alcalina. A versão neutra detecta, exclusivamente, quebras de fita dupla no DNA (OSTLING & JOHANSON, 1984), podendo ser considerada menos sensível (BRIANEZI et al., 2009). Já a versão alcalina do ensaio, descrita por Singh et al. (1988), permite a análise do dano do DNA por meio de uma maior variedade de lesões, como quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, pontes entre DNA-DNA e DNA-proteína (TICE et al., 2000), sendo essa a versão do ensaio do cometa utilizada neste trabalho.

Tice et al. (2000) recomendam a verificação da viabilidade celular antes da realização do ensaio do cometa, a qual deve ser preferencialmente superior a 70%.

A viabilidade celular foi testada para o ensaio do cometa, utilizando azul de tripan. Esta técnica se baseia no fato de que as membranas intactas de células viáveis não se coram na presença deste corante, sendo, portanto, marcador para análise de viabilidade celular (STROBER, 2001). Os resultados não mostraram diferença na relação de células viáveis no fígado, rim e coração nos grupos tratados com lasiodiplodana comparado com os grupos controle negativo. O grupo DXR também não apresentou diferença na relação de células viáveis dos tecidos testados quando comparado com o grupo controle negativo. A viabilidade celular em todos os tecidos analisados foi superior a 75% nos grupos de tratamento quando comparado ao grupo controle negativo (dados não mostrados).

A avaliação dos danos ao DNA foi realizada pelos parâmetros *Tail Intensity* (% DNA migrado na cauda) e *Tail moment* (intensidade de fluorescência na cauda, multiplicado pelas distâncias relativas do centro da cabeça do nucleoide, dividido pelo total da intensidade do cometa). O *Tail Intensity* ou % de DNA na cauda é um parâmetro muito recomendado na análise automatizada, uma vez que está diretamente relacionado com a frequência de quebra de DNA sobre vários níveis de dano (HARTMANN et al., 2003). Já o uso do *Tail moment* nos mostra com apenas um valor a quantidade de dano no material genético, bem como a distância da migração deste (HELLMAN et. al., 1995). A fotomicrografia de um nucleoide típico deste ensaio está demonstrado na Figura 3.

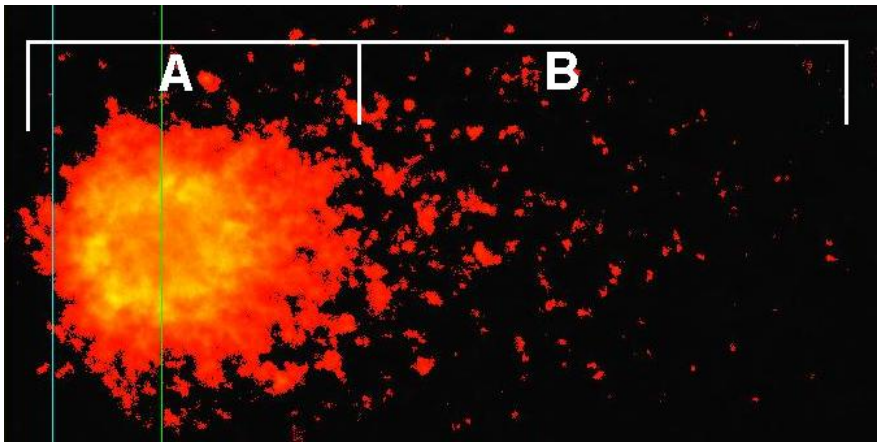

Figura 3: Fotomicrografia de nucleoide de sangue periférico contendo cabeça (A) e cauda (B). Coloração: GelRed; aumento original de 200x. Foto: Michela Bianchi, Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP.

A análise de 100 nucleoides é amplamente recomendada e utilizada para o ensaio do cometa (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; COLLINS et al., 2008; LORENZO et al., 2013; VAN DER LEEDE et al., 2014; IBERO-BAIRABAR et al., 2015; ENCISO et. al., 2015), porém, também encontram-se na literatura estudos que analisaram a quantidade de 50 nucleoides por amostra (MILOSHEV et al., 2002; SASAKI et al., 2002; CONTIJO et al., 2003; BENKOVIC et al., 2008; BENKOVIC et al., 2009). Em Setembro de 2014, a OECD publicou o Guideline 489 para o ensaio do cometa alcalino *in vivo* (originalmente intitulado "*In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay"), onde recomenda a análise de 150 nucleoides por amostra, para 5 animais por dose de tratamento. Neste estudo foram analisados 100 nucleoides por amostra, em 6 animais por grupo de tratamento.

A sensibilidade deste ensaio *in vivo* foi evidenciada pelo aumento significativo da % de DNA na cauda e *Tail moment* entre o grupo DXR em comparação ao grupo controle negativo. Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa em fígado, rim, coração e sangue periférico demonstraram aumento significativo da % de DNA na cauda (Figura 4) e *Tail moment* (Figura 5) do grupo DXR comparado com os grupos lasiodiplodana e controle negativo, confirmando assim a validação deste marcador. Este resultado está de acordo com trabalhos descritos na literatura sobre os danos induzidos pela DXR nestes tipos celulares (ALMEIDA et al., 2012; HERNANDES et al., 2014; TOLENTINO et al., 2015). A lasiodiplodana nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg p.c. não aumentou a % de DNA na cauda e *Tail moment* em tecido hepático, renal, cardíaco e em células de sangue periférico, quando comparados ao grupo controle, demonstrando que a lasiodiplodana, nas doses testadas, não apresentou efeito genotóxico pelo ensaio do cometa, nas células analisadas.

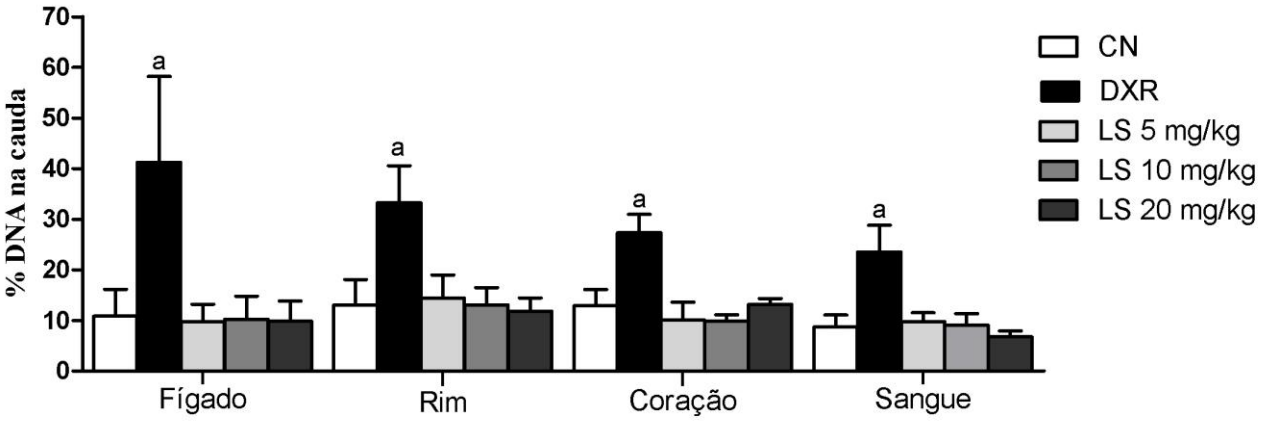

Figura 4: Porcentagem de DNA (% DNA) na cauda no ensaio cometa em células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com LS. CN: controle negativo; DXR: doxorrubicina (15 mg/kg p.c. 24h antes da eutanásia); LS: lasiodiplodana. [a]Estatisticamente diferente do CN. ANOVA uma via seguido de teste de Dunnett ($p<0.05$). Dados referentes à 6 animais por grupo.

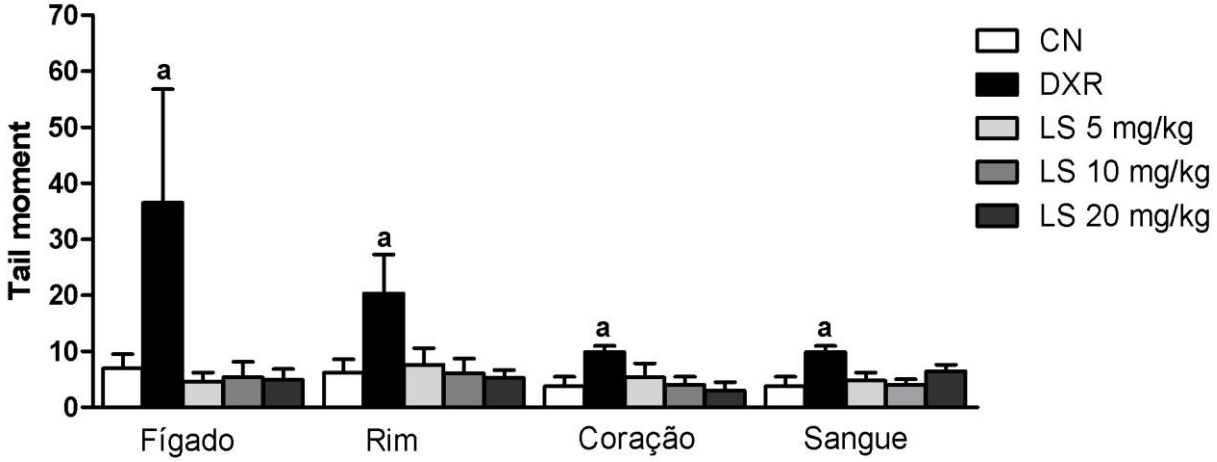

Figura 5: *Tail* moment de nucleoides de células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com LS. CN: controle negativo; DXR: doxorrubicina (15 mg/kg p.c. 24h antes da eutanásia); LS: lasiodiplodana. [a]Estatisticamente diferente do CN. ANOVA uma via seguido de teste de Dunnett ($p<0.05$). Dados referentes à 6 animais por grupo.

A avaliação da antigenotoxicidade foi realizada também em células de fígado, rim, coração e sangue periférico. O tratamento com a lasiodiplodana, em todas as doses testadas, foi capaz de reduzir significativamente os danos no DNA induzido pela DXR, observados pela diminuição estatisticamente significativa na % de DNA na cauda (Figura 6) e *Tail moment* (Figura 7) nas células de fígado, rim, coração e sangue periférico, em comparação aos animais tratados somente com a DXR – demonstrando efeito antigenotóxico nessas células de maneira não dose-dependente. Estes resultados indicam o efeito protetor da lasiodiplodana sobre os danos causados no DNA pela DXR.

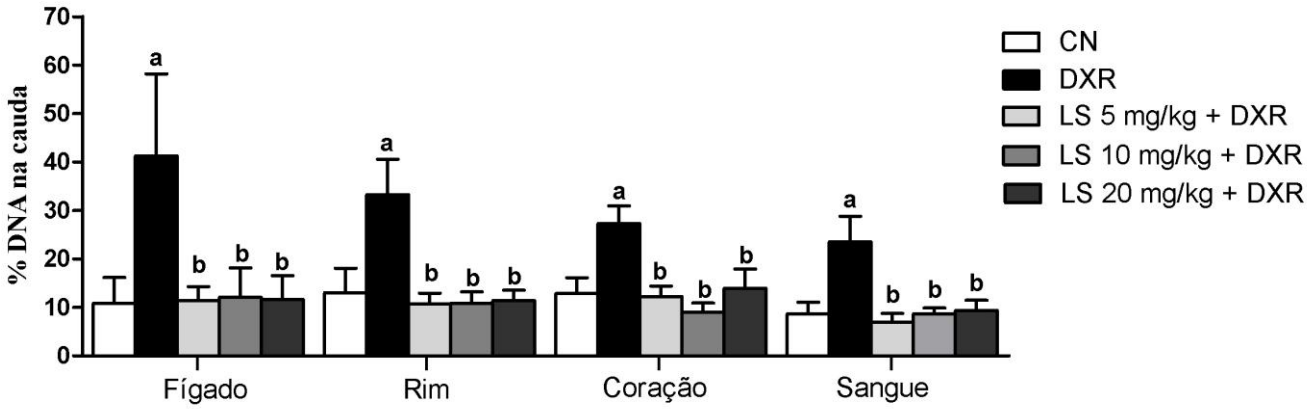

Figura 6: Porcentagem de DNA (% DNA) na cauda no ensaio cometa em células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com LS e 24 h após administração de DXR (15 mg/kg p.c.). CN: controle negativo; DXR: doxorrubicina; LS: lasiodiplodana. [a]Estatisticamente diferente do CN. [b]Estatisticamente diferente de DXR. ANOVA uma via seguido de teste de Dunnett ($p<0.05$). Dados referentes a 6 animais por grupo.

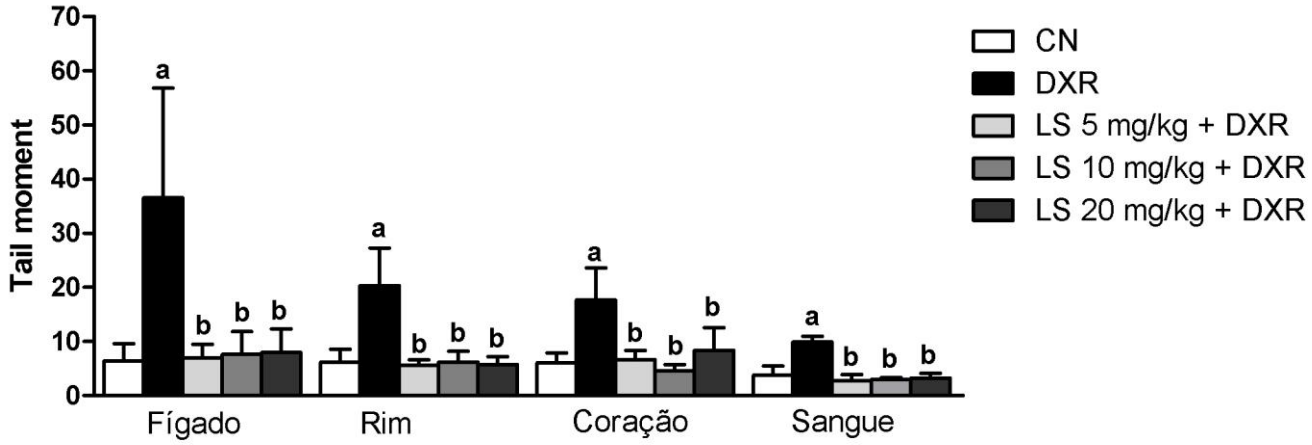

Figura 7: *Tail* moment de nucleoides de células hepáticas, renais, cardíacas e de sangue periférico de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com LS e 24 h após administração de DXR (15 mg/kg p.c.). CN: controle negativo; DXR: antitumoral doxorrubicina; LS: lasiodiplodana. [a]Estatisticamente diferente do CN. [b]Estatisticamente diferente de DXR. ANOVA uma via seguido de teste de Dunnett ($p<0.05$). Dados referentes a 6 animais por grupo.

Os testes *in vivo* são importantes na identificação de substâncias com ação genotóxica e antigenotóxica (TICE et al*.,* 2000), uma vez que esses modelos experimentais permitem considerar as características envolvidas na metabolização da substância em estudo, sendo uma forma mais completa que ensaios *in vitro* (KRISHNA; HAYASHI, 2000). O ensaio do cometa, quando realizado *in vivo,* pode ser aplicado em qualquer tecido, desde que seja possível a obtenção de uma suspensão celular (HARTMANN et al., 2003; OECD 489). O fígado e o rim foram os órgãos de escolha para realizar o ensaio do cometa por apresentarem transferência de xenobióticos ligados às proteínas levando ao acúmulo de substâncias nesses órgãos. Também permitem observar o efeito da substância após sua metabolização (GREGUS; KLAASSEN, 2001). Além disso, o fígado é um dos principais órgãos recomendados para o ensaio do cometa pela OECD 489, uma vez que este é frequentemente um órgão-alvo para a carcinogenicidade. O coração foi utilizado no ensaio do cometa por ser um dos órgãos-alvo de toxicidade da DXR, uma vez que este antitumoral é responsável por alterações estruturais nos cardiomiócitos (TACAR et al. 2013). A análise do cometa em sangue periférico foi realizada para avaliação da substância teste sobre o sistema circulante do organismo vivo, permitindo observar níveis de danos ao DNA nessas células (KUWURU et al., 2014). A utilização de vários órgãos de um mesmo animal vem se tornando recorrente em

estudos de genotoxicidade, em função da possibilidade de avaliar os danos ao DNA de diversos órgãos de um mesmo animal, como fígado, coração e rins (NAGAOKA et al., 2011).

Alguns autores já avaliaram diferentes tipos de β-glucanas frente à indução de genotoxicidade e capacidade antigenotóxica (TOHAMY et al*.,* 2003; OLIVEIRA, et al*.,* 2013). No estudo realizado por Oliveira et al. (2013), a β-glucana extraída do fungo *Saccharomyces cerevisiae* não demonstrou genotoxicidade, além de ser capaz de reduzir de 59 a 94% o dano no DNA induzido pela ciclofosfamida em camundongos. Também não foi identificado potencial genotóxico em β-glucanas fúngicas como a β-(1→3; 1→4)-D-glucana e a β-(1→3; 1→6)-D-glucana (DELANEY; de VOGEL; KRUL, 2004). No presente estudo, as três diferentes doses (5, 10 ou 20 mg/kg p.c.) da lasiodiplodana, isoladamente, não causaram aumento na % de DNA na cauda nem no *Tail moment* em fígado, rim, coração e sangue periférico observado no ensaio do cometa (Figuras 4 e 5, respectivamente), indicando a ausência de genotoxicidade desse polissacarídeo nos tecidos avaliados.

Na avaliação antigenotóxica, a lasiodiplodana demonstrou capacidade de proteção do DNA sobre danos induzidos pela DXR, nas três doses testadas (5, 10 ou 20 mg/kg p.c.) em todos os tecidos avaliados (Figuras 6 e 7) (Tabela 2). Attia et al. (2013) avaliaram os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos *in vivo* da β-glucana fúngica β-(1→3)-D-glucana, podendo observar a ausência de genotoxicidade, e ainda a capacidade de proteção contra os danos ao DNA causados pelo antitumoral paclitaxel em camundongos.

Tabela 2: Porcentagem de redução de DNA (% DNA) na cauda no ensaio cometa tecidos analisados de ratos Wistar após 14 dias de tratamento com LS e 24 h após administração do antitumoral DXR (15 mg/kg p.c.).

Tratamento	Redução (%)							
	Fígado		Rim		Coração		Sangue	
	T.M.	*T. I.*	*T.M.*	*T. I.*	*T.M.*	*T. I.*	*T.M.*	*T. I.*
LS 5mg/kg + DXR	76,92	98,15	103,8	111,5	94,99	104,4	115,9	116,1
LS 10mg/kg + DXR	96,07	96,01	99,64	111,4	112,9	126,7	112,4	99,86
LS 20mg/kg + DXR	94,91	97,36	102,5	108,2	80,31	92,79	107,8	95,29

DXR: antitumoral doxorrubicina; LS: lasiodiplodana*. T. I.: Tail moment; T. I. Tail intensity.* Dados referentes a 6 animais por grupo.

Os mecanismos de ação envolvidos na atividade biológica das β-glucanas ainda vêm sendo elucidados (KAGIMURA et al., 2015). Há evidências de que essas atividades ocorram por meio de uma cascata de eventos, incluindo ligações específicas para macrófagos e interações com seus receptores, e ainda a sinalização para expressão de genes que regulam a apoptose durante os eventos de proliferação celular (NOVAK & VETVICKA, 2009). Tais evidências estariam de acordo com os relatos de atividades de regulação do sistema imune das β-glucanas. Pillai et al. (2014) associaram o efeito protetor aos danos ao DNA causado por radiação em linfócitos humanos às características estruturais da β-glucana, e também relacionaram a capacidade dessas substâncias em agir com células envolvidas na imunidade, resultando na produção de modificadores da resposta biológica. Desse modo, sugere-se que a lasiodiplodana tenha ação nas membranas extracelulares, de forma a estimular a proteção contra os danos no DNA.

6.4 Investigação da atividade mutagênica e antimutagênica da lasiodiplodana em células de medula óssea e sangue periférico

A avaliação da progressão de eritrócitos PCEs e NCEs na medula é um importante indicador de citotoxicidade, o que pode ser realizado juntamente com o teste do micronúcleo na medula óssea (VENKATESH, 2007), indicada quando há uma redução significativa na percentagem de PCE entre o total de eritrócitos na medula (NCE + PCE) (RIBEIRO, 2003). A determinação da citotoxicidade de compostos na medula óssea foi feita por meio da relação PCE/NCE, analisando-se 500 eritrócitos, como demonstrado na Figura 8.

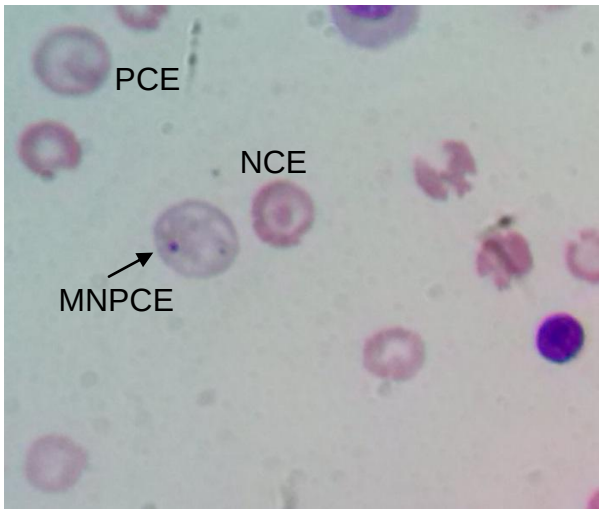

Figura 8: Fotomicrografia de esfregaço de medula óssea de rato Wistar 24 horas após administração de doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c. i.p.) NCE: Eritrócito normocromático; PCE: Eritrócito policromático; MNPCE: Eritrócito policromático com micronúcleo. Coloração: Giemsa; aumento original de 1000x (imersão). Foto: Michela Bianchi de Mello, Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP.

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que a relação PCE/NCE dos grupos lasiodiplodana foram semelhantes ao controle negativo, não apresentando citotoxicidade. A relação PCE/NCE é um indicador de aceleração ou inibição da eritropoiese, sendo que um declínio nessa relação fornece evidências da citotoxicidade da substância teste. Não houve redução significativa na relação PCE/NCE em nenhum dos grupos avaliados, demonstrando ausência de citotoxicidade.

A sensibilidade do teste do MN em medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar foi evidenciada pelo aumento da frequência de MNPCE e MNRET (Figura 9) induzidos pela DXR, respectivamente (Tabela 3). A lasiodiplodana não causou, isoladamente, mutações cromossômicas no DNA que refletissem em maior frequência de MN em células de medula óssea e sangue periférico quando comparada com o controle negativo. Porém, os animais do grupo DXR tiveram a frequência de MN aumentada significativamente em ambas as populações celulares quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

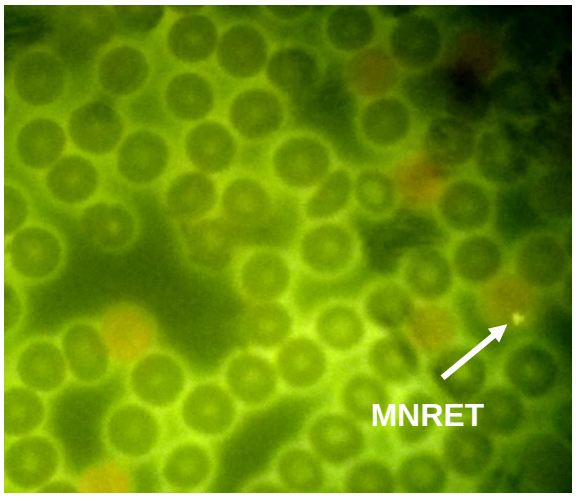

Figura 9: Fotomicrografia mostrando um micronúcleo (seta) em reticulócito (coloração laranja) de sangue periférico de rato Wistar 24 horas após administração de doxorrubicina (15 mg/kg p.c. i.p.). Coloração: laranja de acridina; aumento original de 1000x (imersão). Foto: Michela Bianchi de Mello, Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP.

Na avaliação da antimutagenicidade, todas as doses da lasiodiplodana foram capazes de reduzir significativamente a frequência de MNPCE e MNRET quando comparado ao grupo DXR na medula óssea e sangue periférico, respectivamente (Tabela 3), concordando com os efeitos antigenotóxicos observados por meio do ensaio do cometa.

Alguns autores já relataram a capacidade de diferentes isolados de β-glucanas em inibir a formação de células micronucleadas (KRIZKOVA et al., 2006; MIRANDA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Os resultados do estudo realizado por Oliveira et al. (2014) demonstraram a atividade quimiopreventiva da β-glucana em células somáticas e germinativas, utilizando o teste do micronúcleo em camundongos machos expostos à ciclofosfamida. Para outro isolado, a botriosferana, foi observada a atividade protetora dose-dependente (7,5, 15 e 30 mg/kg p.c. por 15 dias) diante de danos ao DNA induzidos pelo antitumoral ciclofosfamida, realizada por meio do teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea de camundongos. A botriosferana reduziu a frequência de células micronucleadas em 78% na medula óssea e 82% em sangue periférico (MIRANDA et al., 2008).

Tabela 3: Frequência (média±desvio padrão) eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) e de reticulócitos micronucleados (MNRET) no sangue periférico, porcentagem de redução e relação PCE/NCE em células de medula óssea de ratos Wistar tratados por 14 dias com diferentes doses de lasiodiplodana (LS) associadas ou não com DXR (15 mg/kg p.c. i.p.)

Grupo	Medula Óssea*			Sangue Periférico**	
	MNPCE/1000	Redução	PCE/NCE	MNRET/1000	Redução
Controle Negativo	1,8±0,8		0,75±0,03	3,5±1,9	
LS 5mg/kg	2,0±1,2		0,73±0,05	3,0±2,9	
LS 10mg/kg	3,4±1,1		0,75±0,06	3,5±2,4	
LS 20mg/kg	4,0±2,4		0,76±0,06	4,1±2,0	
DXR	15,6±3,4[a]		0,66±0,10	13,6±1,6[a]	
LS 5mg/kg + DXR	3,8±2,3[b]	85%	0,69±0,02	4,6±0,8[b]	89%
LS 10mg/kg + DXR	4,1±2,7[b]	83%	0,70±0,08	5,2±3,0[b]	83%
LS 20mg/kg + DXR	4,4±2,8[b]	81%	0,67±0,06	7,0±1,6[b]	65%

*2000 e **1000 células foram analisadas por animal, com seis animais por grupo. [a]Diferença significativa em relação ao Controle Negativo ($p<0.05$). [b]Diferença significativa em relação a DXR. ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet foram usados para determinar as diferenças significativas.

6.5 Glutationa reduzida e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Neste estudo, parâmetros de estresse oxidativo foram analisados a fim de verificar possíveis efeitos antioxidantes da lasiodiplodana em células hepáticas, renais e cardíacas.

Os resultados obtidos frente às concentrações de GSH em fígado, rim e coração, mostram que o tratamento com lasiodiplodana não foi capaz de alterar significativamente ($p>0,05$) tais concentrações nesses tecidos em nenhuma das doses testadas (Tabelas 3).

Tabela 3: Concentrações teciduais de glutationa reduzida (GSH) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados por 14 dias com diferentes doses de lasiodiplodana (LS) associadas ou não com DXR (15 mg/kg p.c. i.p.)

Grupo	GSH (*nmol/mg proteína*)		
	Fígado	Rim	Coração
CN	47,08±12,90	24,43±03,20	24,77±12,50
LS 5mg/kg	39,40±07,36	31,57±12,55	19,89±07,89
LS 10mg/kg	45,45±07,00	35,65±18,67	23,42±10,68
LS 20mg/kg	48,40±08,88	31,80±11,95	25,29±15,27
DXR	39,46±09,64	23,33±02,62	11,61±03,25
LS 5mg/kg + DXR	17,19±09,40	25,95±07,90	38,01±16,39
LS 10mg/kg + DXR	35,32±13,13	18,47±06,30	27,80±09,19
LS 20mg/kg + DXR	34,74±17,08	17,88±08,90	31,42±12,74

Os valores representam média ± desvio pardão de 6 animais por grupo. CN: controle negativo; LS: lasiodiplodana em 3 diferentes doses (5, 10 ou 20 mg/kg p.c.); DXR: doxorrubicina. Não houve diferença estatisticamente significativa. ANOVA uma via seguido de teste de Dunnett ($p<0.05$).

Os resultados obtidos referentes às concentrações de TBARS mostram que a DXR aumentou significativamente ($p<0,05$) as concentrações de TBARS nas células cardíacas em comparação ao controle negativo (Tabela 4). Estes resultados corroboram com as evidências de cardiotoxicidade da DXR (TACAR et al., 2013). Hernandes et al. (2014) demonstraram que a DXR foi capaz de aumentar as concentrações de TBARS no tecido cardíaco (78,34±15,45 nmol/g proteína) por meio da administração de 16 mg/kg p.c. i.p. 24 horas antes da eutanásia. Nossos resultados demonstraram que a lasiodiplodana foi capaz de reduzir significativamente as concentrações de TBARS no tecido cardíaco nas doses de 10 e 20 mg/kg p.c. quando administrado por via oral em ratos (Tabela 4), evidenciando que a lasiodiplodana é capaz de atenuar a peroxidação lipídica induzida pela DXR no coração. Esses resultados corroboram com estudos recentes com β-glucanas que demonstraram seus efeitos antioxidantes (KANAGASABAPATHY et al., 2013; USKOKOVIC et al., 2013; MAITY et al., 2014). Não há um mecanismo exato definido para o potencial antioxidante de polissacarídeos. Em geral, estes efeitos estão relacionados com a conformação estrutural em tripla hélice que estas substâncias

apresentam, o que possibilita o fornecimento de hidrogênios ou elétrons para a molécula (SHI et al., 2013). Há evidências de que os polissacarídeos podem possuir capacidade de doar hidrogênios por sua fraca energia de dissociação da ligação OH (JIN et al. 2011; SHI et al. 2013).

Kogan et al. (2008) evidenciaram potente efeito inibidor da β-glucana derivada de *S. cerevisae* sobre a peroxidação lipídica comparáveis a dos antioxidantes conhecidos, como α-tocoferol e D-manitol, e exercendo proteção sobre danos oxidativos ao DNA.

A DXR não provocou o aumento da peroxidação lipídica em fígado e rim de ratos. Isso pode ter ocorrido em decorrência da DXR ter exercido efeito tecido-específico. Em estudo realizado por El-Moselhy & El-Sheikh (2014) utilizando DXR como agente indutor de estresse oxidativo na dose de 15 mg/kg p.c. com aplicação única por via i.p. 5 dias antes da eutanásia, a DXR induziu aumento significativo das concentrações de TBARS e diminuição de GSH e CAT (catalase) em fígado e rim de ratos, comparado com o grupo controle negativo.

Tabela 4: Concentrações teciduais substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados por 14 dias com diferentes doses de lasiodiplodana (LS) associadas ou não com DXR (15 mg/kg p.c. i.p.)

Grupo	TBARS *(nmol/mg de proteína)*		
	Fígado	Rim	Coração
CN	0,49±0,11	0,36±0,24	0,33±0,13
LS 5mg/kg	0,44±0,19	0,54±0,33	0,59±0,28
LS 10mg/kg	0,41±0,11	0,46±0,18	0,54±0,27
LS 20mg/kg	0,53±0,16	0,51±0,21	0,61±0,20
DXR	0,78±0,22	0,68±0,30	1,04±0,46[a]
LS 5mg/kg + DXR	0,63±0,26	0,64±0,27	0,74±0,32
LS 10mg/kg + DXR	0,62±0,22	0,72±0,24	0,59±0,19[b]
LS 20mg/kg + DXR	0,76±0,42	0,59±0,17	0,62±0,30[b]

Os valores representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. CN: controle negativo; LS: lasiodiplodana em 3 diferentes doses (5, 10 ou 20 mg/kg p.c.); DXR: doxorrubicina. [a]Estatisticamente diferente de CN. [b]Estatisticamente diferente de DXR. ANOVA seguido de teste de Dunnett ($p<0.05$).

Estes resultados sugerem que o principal efeito protetor da lasiodiplodana, possivelmente, não está relacionado com prevenção da peroxidação lipídica, haja vista que não houve alteração de TBARS e GSH nos outros tecidos, além do coração. De fato, Giese et al. (2015), em um estudo sobre a eficácia de eliminação de radicais livres *in vitro por* β-glucanas, demonstraram que a lasiodiplodana possui baixa atividade contra a peroxidação lipídica e contra a eliminação de peróxido de hidrogênio, evento que é normalmente atribuído à ação de GSH, em comparação com outras β-glucanas, mas possui um relevante potencial de eliminar radicais de óxido nítrico. Este efeito da lasiodiplodana é interessante na comparação dos resultados dos ensaios de danos ao DNA do presente estudo.

De fato, foi demonstrado que a doxorrubicina aumenta a síntese de óxido nítrico (ALDIERI et al, 2002). Guerra et al. (2005) demonstraram que um dos mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade da doxorrubicina é a formação de radicais de óxido nítrico. Além disso, altas concentrações de óxido nítrico estão relacionadas com o aumento de danos ao DNA (BURNEY et al., 1999; FOLKES e O'NEILL, 2013), contribuindo assim para explicação dos resultados encontrados no

ensaio cometa e no teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico, onde DXR foi estatisticamente significativo.

6.6 Considerações finais

Há inúmeros estudos relacionados aos efeitos benéficos de β-glucanas em diferentes sistemas fisiológicos, no entanto, os mecanismos de ação destas substâncias ainda são pouco esclarecidos.

A lasiodiplodana é uma β-glucana fúngica ainda pouco explorada quanto aos seus efeitos benéficos biológicos e toxicológicos. Dessa forma, nosso trabalho tem grande importância na elucidação das atividades desta substância.

Por meio dos resultados obtidos neste estudo podemos sugerir que a lasiodiplodana não causa danos ao DNA, como observado no ensaio do cometa e teste do micronúcleo, e também não induz estresse oxidativo, uma vez que não alterou as concentrações de GSH e TBARS. Esses dados são relevantes por tratar-se de uma substância com potencial aplicação clínica, devendo assim, não apresentar efeitos que coloquem em risco a saúde.

Além disso, a ladiodiplodana demonstrou-se eficiente em proteger o DNA de danos induzidos pela DXR, podendo possivelmente ser classificada como antigenotóxica e antimutagênica. Associada à esses efeitos, a lasiodiplodana ainda foi capaz de reduzir o aumento da peroxidação lipídica no tecido cardíaco também induzido pela DXR, indicando atividade antioxidante.

Estes resultados são promissores e influenciarão no futuro emprego farmacológico da lasiodiplodana. Porém, ainda há a necessidade de amplos estudos *in vitro* e ensaios pré-clínicos com humanos utilizando está β-glucana, a fim de esclarecer o seu mecanismo de ação.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições empregadas no presente estudo, os nossos resultados mostraram que a lasiodiplodana:

- ✓ Não foi genotóxica em nenhuma das doses testadas em células de fígado, rim, coração e sangue periférico de ratos Wistar;
- ✓ Não apresentou efeito mutagênico e citotóxico, em nenhuma das doses avaliadas, em células da medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar;
- ✓ Não modulou os marcadores GSH e TBARS, indicadores de estresse oxidativo, nos tecidos de ratos Wistar avaliados, em nenhuma das doses testadas;
- ✓ Exerceu atividade antigenotóxica sobre danos induzidos pela DXR em células de fígado, rim, coração e sangue periférico;
- ✓ Apresentou ação antimutagênica em células de medula óssea e sangue periférico nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg p.c.
- ✓ Nas doses de 10 ou 20 mg/kg p.c., foi capaz de prevenir estresse oxidativo causado pela DXR em células de tecido cardíaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 Referências Bibliográficas

AISSA, A. F.; BIANCHI, M. L.; RIBEIRO, J. C.; HERNANDES, L. C.; DE FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L. M. Comparative study of beta-carotene and microencapsulated beta-carotene: evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1418-1424, 2012.

AISSA, A. F.; GOMES, T. D.; ALMEIDA, M. R.; HERNANDES, L. C.; DARIN, J. D.; BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. Methionine concentration in the diet has a tissue-specific effect on chromosomal stability in female mice. **Food And Chemical Toxicology**, Oxford, v. 62, p. 456-462, 2013.

ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D.; HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. **Plant Foods For Human Nutrition**, Dordrecht, v. 67, p. 171-177, 2012.

ALMEIDA, M. R.; AISSA, A. F.; URSULA HERMOGENES GOMES, T. D.; DARIN, J. D.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. In vivo genotoxicity and oxidative stress evaluation of an ethanolic extract from piquiá (*Caryocar villosum*) pulp. **Journal Of Medicinal Food**, New York, v. 16, p. 268-271, 2013.

ANTILLA, H.; SOTANG-STROHM, T.; SALOVAARA, H. Viscosity Of B -Glucan In Oat Products. **Agricultural and Food Science,** Helsinque, v. 13, p. 1-2, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** Brasília, 2008.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Gerência De Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF,** Brasília, 2013.

ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTINI, G.; GREIN, A.; OREZZI, P.; POL, C.; SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from

S. peucetius var. caesius. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p. 1101-1110, 1969.

AUINGER, A.; RIEDE, L.; BOTHE, G. Yeast (1,3)-(1,6)-β-glucan helps to maintain the body´s defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects. **European Journal of Nutrition,** Darmstadt, v. 52, p. 1913-8, 2013.

BAE, I. Y.; KIM, H. W.; YOO, H. J.; KIM, E. S.; LEE, S.; PARK, D. Y.; LEE, H. G. Correlation of branching structure of mushroom β-glucan with its physiological activities. **Food Research International**, v. 51, p. 195–200, 2013.

BAUERMEISTER, A; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Fungal B-1,3-Glucanases: production and biotechnological applications. **Semina: Ciêncas Exatas e Tecnológicas,** Londrina, v. 31, p. 75-86, 2010.

BERRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. D. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURNEY, S. et al. . The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 37-49, 1999.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β-(1→3),(1→6)-glucans. **Mycological Research,** Cambridge, v. 111, p. 635-652, 2007.

CHEN, S. N.; NAN, F. H.; CHEN, S.; WU, J. F.; LU, C. L.; SONI, M. G. Safety assessment of mushroom β-glucan: subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. **Food And Chemical Toxicology,** Oxford, v.49, p. 2890-8, 2011.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research. Reviews In Mutation Research,** Amsterdam, v. 759, p. 27-39, 2014.

CUNHA, M. A. A.; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan, an exocellular β(1→6)-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** Berlin v. 39, p. 1179–1188, 2012.

CUSTER, L. L.; SWEDER, K. S. The role of genetic toxicology in drug discovery and optimization. **Current Drug Metabolism,** Hilversum, v. 9, n. 9, p. 978-85, 2008.

DELANEY, B.; de VOGEL, N.; KRUL, C. A. Evaluation of the *in vivo* genetic toxicity of concentrated barley β-glucan. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, p. 155-6, 2004.

DEMIR, D.; KLEIN, HO.; MANDEL-MOLINAS N, TUZUNER N. Beta-glucan induces proliferarion and activatioon of monocytes in peripherical blood of patients with advanced breast cancer. **International Imunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, p. 113–116, 2007.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 421-431, 1990.

EL KHOURY, D.; CUDA, C.; LUHOVYY, B.L.; ANDERSON, G.H. Beta glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome**. Journal of Nutrition and Metabolism,** New York, doi: 10.1155/2012/851362 2012.

EL-MOSELHY, M. A.; EL-SHEIKH, A. A. Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 68, p. 101-110, 2014.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research,** New York, v. 61p. 567, 2004.

FARKAS, V. Biosynthesis of cell walls of fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 43(2), p. 117-44, 1979.

FEDATO, R. P.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylesculetin in vivo and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. **Journal of Applied Toxicology,** Philadelphia, 2012.

FINIMUNDY, T. C.; GAMBATO, G.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; HESS, J.; HENRIQUES, J. A. P.; DILLON, A. P. J.; ROESCH-ELY, M. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and Pleurotus sajor-caju exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity **Nutrition research**, New York, v. 33, p. 76 – 84, 2013.

FDA, Food and Drug Administration. Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. **ICH Guideline,** Junho, 2012.

FOLKES, L. K.; O'NEILL, P. DNA damage induced by nitric oxide during ionizing radiation is enhanced at replication. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 34, p. 47-55, 2013.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 30, n. 1–2, p. 1-12, 2009.

GREGUS, Z.; KLAASEN, C.D. Mechanism of Tocixity. In: Casarett & Doull's. Toxicology: **The Basic Science of Poisons**, New York: McGraw-Hill, 2001.

GUTTERIDGE & HALLIWELL. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p. 136-47, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews,** Baltimore, v. 70, p. 257–265, 2012.

HARTMANN A, AGURELL E, BEEVERS C, BRENDLER-SCHWAAB S, BURLINSON B, CLAY P, COLLINS A, SMITH A, SPEIT G, THYBAUD V, TICE RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, Washington, v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HAYASHI, M., et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; MORITA, T. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research,** Amsterdam, v. 252, p. 281-287, 1991.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMA, W.; GIBSON, D. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay: III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 627, p. 10-30, 2007.

HEDDLE, J. A.; FENECH, M.; HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T. Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis.** England, v. 26, p. 3-10, 2011.

HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; DE ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D.' C.; RODRIGUES, E.; BATISTA, B. L.; JÚNIOR, F. B.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. *In vivo* assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit, **Food Research International**, doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.036, 2014.

HO, E.; KARIMI GALOUGAHI, K.; LIU, C. C.; BHINDI R, FIGTREE G. A. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 1, p. 483-491, 2013.

HOLDEN, H. E.; MAJESKA, J. B.; STUDWELL, D. A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the micronucleus assay. **Mutation research**, Amsterdam, v. 13, p. 87-9, 1997.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, V. P.; FÁTIMA, A. de. Glutationa e enzimas relacionadas: Papel biológico. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

INJAC, R.; STRUKELJ, B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. **Technology In Cancer Research & Treatment**, Schenectady, v. 7, p. 497–516, 2008.

JIN, M.; LU, Z.; HUANG, MM.; WANG, Y.; WANG, Y. Sulfated modification and antioxidante activity of exopolysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. **International Journal of Biological Macromolecules,** Amsterdam, v. 48, p. 607-612, 2011.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F.; MALFATTI, C. R. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 72, p. 588-598, 2015.

KANAGASABAPATHY,G.; MALEK, S. N. A.; MAHMOOD, A. A.; CHUA, K. H.; VIKINESWARY, S.; KUPPUSAMY, U. R. Beta-Glucan-Rich Extract from Pleurotus sajor-caju(Fr.) Singer Prevents Obesity and Oxidative Stress in C57BL/6J Mice Fed on a High-Fat Diet. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** St. Louis, http://dx.doi.org/10.1155/2013/185259, 2013.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J. K.; SEO, Y. R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal Of Cancer Prevention**, Seoul, v. 18, p. 277-88, 2013.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRIJM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research,** New York, v.96, p.363-389, 1996.

KOGAN, G.; PAJTINKA, M.; BABINCOVA, M.; MIADOKOVA, E.; RAUKO, P.; SLAMENOVA, D.; KOROLENKO, T. A. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: Can they fight cancer? **Neoplasma**, Bratislava v.55, n.5, p.387-393, 2008.

KRISHNA G, HAYASHI M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, New York, v. 455, p. 155–166, 2000.

KRIZKOVÁ L, ZITNANOVÁ I, MISLOVICOVÁ D, MASÁROVÁ J, SASINKOVÁ V, DURACKOVÁ Z, KRAJCOVIC J. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. **Mutation Research**, New York, v 606, p. 72-79, 2006.

KOVVURU, P.; MANCILLA, P. E.; SHIRODE, A. B.; MURRAY, T. M.; BEGLEY, T. J.; RELIENE, R. Oral ingestion of silver nanoparticles induces genomic instability and DNA damage in multiple tissues. **Nanotoxicology**, London, DOI: 10.3109/17435390.2014.902520, 2014.

JANERO, D. V. Malondialdehyde And Thiobarbituric Acid-Reactivity As Diagnostic Indices Of Lipid Peroxidation And Peroxidative Tissue Injury. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 9, p. 515-540, 1990.

LAZAROVÁ, M.; LÁBAJ, J.; ECKL, P.; KOGAN, G.; SLAMENOVÁ, D. Effects of dietary intake of a fungal β-D-glucan derivative on the level of DNA damage induced in primary rathepatocytes by various carcinogens. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 56, p.113-22, 2006.

LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer proprieties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. **Contemporary Oncology,** Poznań, v. 16, p. 285–289, 2006.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, 2001.

LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E., MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas,** Chapadinha, v.6, p. 10-16, 2012.

MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J.; MORI, M. P.; KUASNE, H.; GREGÓRIO, E. P.; LIBOS, F. J. R.; DE SYLLOS CÓLUS, I. M. Protective effect of carboxymethyl-glucan against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 131-135 2011.

MAITY, P.; SAMANTA, S.; NANDI, A. K.; SENA, I. K.; SOUMITRA PALOIB,KRISHNENDU ACHARYAB, SYED S. ISLAM. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble β-D-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*.

International Journal of Biological Macromolecules, Amsterdam, v. 63, p. 140–149, 2014.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, London, v. 9, p. 783–789, 1985.

MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; B, ANGELI, J. P. F.; OLIVEIRA, A. R. J.; SILVA, A. A. F.; RIBEIRO, R. L. β-glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 658, p. 154–161, 2008.

MASUDA, Y.; INOUE, H.; OHTA, H.; MIYAKE, A.; KONISHI, M.; NANBA, H. Oral administration of soluble β-glucans extracted from *Grifola frondosa* induces systemic antitumor immuneresponse and decreases immunosuppression in tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, New York, v. 133, p.108–120, 2013.

MENDES, S. F.; SANTOS, O. Jr. dos; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F.; ARANDA-SELVERIO, G.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F.; SÁ PEREIRA, M.; TOVAR A. M.; MOURÃO, P. A.; SILVA, M. D. E. L. da. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 1, p. 305-9, 2009.

MIKKELSEN, M. S.; SAVORANI, F.; RASMUSSEN, M. A.; JESPERSEN, B. M.; KRISTENSEN, M.; ENGELSEN, M. B. New insights from a β-glucan human intervention study using NMR metabolomics. **Food Research International**, *In press*, doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.026, 2014.

MIRA, G. S.; GRAF, H.; CÂNDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em β-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, 2009.

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

MIRJANA, M.; JELENA, A.; ALEKSANDRA, U.; SVETLANA, D.; NEVENA, G.; JELENA, M.; IBRAHIM, M.; ANA, S. D.; GORAN, P.; MELITA V. β-Glucan administration to diabetic rats reestablishes redox balance and stimulates cellular

pro-survival mechanisms. **Journal Of Functional Foods,** London, v. 5, p. 267–278, 2013.

MONTEIRO NETO, M. A. B.; LIMA, I. M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, R. K.; SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Antigenotoxicity of artepillin C *in vivo* evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 31, p. 714–719, 2010.

NAGAOKA, M. R.; LE SUEUR-MALUF, L.; AGUIAR, O.; JR, CASTRO G. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; RIBEIRO, D. A. Differential response related to genotoxicity in multiple organs of cirrhotic rats. **Hepatology international**, New York, v. 5(2), p. 740-6, 2011.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 47, n. 5, p. 469-484, 2009

NOVAK, M; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets,** Saif Zone v. 9, p. 67-75, 2009.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, Orlando, v. 504, p. 17-36, 2004.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 407, 1995.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 474, 1997.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 489, 2014.

OLIVEIRA, R. J.; SALLES, M. J.; DA SILVA, A. F.; KANNO, T. Y.; LOURENÇO, A. C.; LEITE, V. D. A. S.; MATIAZI, H. J.; PESARINI, J. R.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. **In vivo evaluation** of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 413-424, 2013.

OLIVEIRA, R. J.; PESARINI, J. R.; SPARÇA SALLES, M. J.; NAKAMURA KANNO, T. Y.; DOS SANTOS LOURENÇO, A. C.; DA SILVA LEITE, V.; DA SILVA, A.

F.; MATIAZI, H. J.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Effects of β-glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 111-119, 2014.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 123, p. 291-298, 1984.

PAN MH, GHAI G, HO CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, p. 43–52, 2008.

PRADA, F. J. A; VOLTARELLI, F. A; OLIVEIRA, C. A. M; GOBATTO, C. A; MACEDO, D. V; MELLO, M. A. R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira Ciência e Movimento,** Brasília, v.12, p. 29-34, 2004.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* In: L. R. RIBEIRO, D. M. F. SALVADORI and E. K. MARQUES. **Mutagênese Ambiental,** 1 ed. Ulbra: Canoas, p. 201-219, 2003.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, p.133-149, 2005.

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D. A. C.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. D. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 695, p. 22-28, 2010.

RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videria. 2003.** Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2003.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; KUBOTA, L. T.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 112-119, 2001.

SCHMID, W. Micronucleus Test. **Mutation Research,** Leiden, v. 31, p. 9-15, 1975.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEGREDO, M. P., et al. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, 2013.

SERPELONI, J. M.; GROTTO, D.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. Lutein improves antioxidant defense *in vivo* and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. **Archives of toxicology**, Berlin, v. 84, p. 811-22, 2010.

SERPELONI, J. M.; GROTTO, D.; AISSA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll B in mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 725, p. 50-56, 2011.

SHI, M.; ZHANG, Z.; YANG, Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). **Carbohydrate Polymers,** London, v. 95, p. 200-206, 2013.

SLAMENOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters,** Amsterdam, v. 198, p. 153–160, 2003.

SŁOCZYŃSKA, K.; POWROŹNIK, B.; PĘKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal Of Applied Genetics**, England, v. 55, p. 273-285, 2014.

SMITH, C. C.; ADKINS, D. J.; MARTIN, E. A.; O'DONOVAN M. R. Recommendations for design of the rat comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p. 233–240, 2008.

SINGH, N. P. MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Maryland Heights, v. 175, p. 184-191, 1988.

STĚRBA, M.; POPELOVÁ, O.; VÁVROVÁ, A.; JIRKOVSKÝ, E.; KOVAŘÍKOVÁ, P.; GERŠL, V.; SIMŮNEK, T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacologicalcardioprotecti on. **Antioxidants & Redox Signaling,** New York, v. 18, 2013,

STEVENSON, L.; PHILLIPS, F.; O'SULLIVAN, K.; WALTON, J. Wheat bran: Its composition and benefits to health, a European perspective. **International Journal of Food Sciences and Nutrition,** Basingstoke, v. 63, p. 1001–1013, 2012.

TACAR, O., SRIAMORNSAK, P. & DASS, C.R., Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **The Journal of pharmacy and pharmacology,** London, v. 65(2), p.157–70, 2013.

TAIOLI, E.; BONASSI, S. Methodological issues in pooled analysis of biomarker studies. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 512, p. 85-92, 2002.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, p. 206-221, 2000.

TOHAMY, A. A.; EL-GHOR, A. A.; EL-NAHAS, S. M.; NOSHY, M. M. β-Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 541, p. 45–53, 2003.

TSAI, M. C.; HUANG, T. L. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a state biomarker of oxidative stress in bipolar patients in a manic phase. **Journal of Affective Disorders**, Amsterdam, v. 173, p. 22-26, 2015.

TSUKADA, K., TAKAHASHI, K., NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry,** Oxford, v. 71, p. 2019-2023, 2010.

TÚRMINA, J. A.; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SANTOS, F. S.; SILVA, L. A.; MALFATTI, C. R. M. Toxicological Assessment of β-(1→6)-D-glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules,** Emeryville, v. 17, p. 14298-14309, 2012.

USKOKOVIC´, A.; MIHAILOVIC´, M.; DINIC´, S.; JOVANOVIC´, J. A.; GRDOVIC´, N.; MARKOVIC´, J.; POZNANOVIC´, G.; VIDAKOVIC´, M. Administration of a β-glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods,** London, v. 5, p. 1966 –1974, 2013.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, A.F.D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARRBONERO, E.R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; SILVA, M. L. R. Three exopolysaccharides of the β(1→6)-D-glucan type and a β(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v. 343, p. 2481–2485, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. D.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β-(1→6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers,** London, v. 92 p. 1908– 1914, 2013.

VASQUES, M. Z. Recommendations for safety testing with the *in vivo* comet assay. **Mutation Research,** Amsterdam, v. 747, p. 142– 156, 2012.

VENÂNCIO, V. P.; SILVA, J. P.; ALMEIDA, A. A.; BRIGAGÃO, M. R. Azevedo L. Conventional (MG-BR46 Conquista) and transgenic (BRS Valiosa RR) soybeans have no mutagenic effects and may protect against induced-DNA damage *in vivo*. **Nutrition And Cancer**, Philadelphia, v. 64, p. 725-31, 2012.

VENKATESH, P.; SHANTALA, B.; JAGETIA, G. C.; RAO, K. K.; BALIGA, M. S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study**. Integrative cancer therapies**, Thousand Oaks, v. 6, p. 42-53, 2007.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, Hong Kong, v. 10, p. 115–119, 2011.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 60, p. 258–274, 2012.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, New York, v. 238, p. 57–85, 1990.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; de WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation, part III: The comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 97, p. 21-26, 2007.

WOLFSEGGER, M. J.; JAKI, T.; DIETRICH, B.; KUNZLER, J. A.; BARKER, K. A note on statistica analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 240, p. 117–122, 2009.

ZEKOVIĆ DB, KWIATKOWSKI S, VRVIĆ MM, JAKOVLJEVIĆ D, MORAN CA. Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. ***Critical Reviews in Biotechnology***, London, v. 25, p. 205–230, 2005.

ZHANG, L. L.; XUELIAN, X. X.; ZENG, F. Correlation between antitumoral activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate research**, Amsterdam, v. 340, p. 1515–1521, 2005.

ZIECH, D.; FRANCO, R.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 711, p. 167–173, 2011.

9 ANEXO

Proc. nº 13.1.218.53.1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAMPUS DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

À
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
Campus de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Senhor Presidente:

Eu, Michela Bianchi de Mello, brasileira, farmacêutica, cédula de identidade (RG) nº 10.94767058 SSP/RS, residente à Rua Guilherme Schimidt, 470 apto 22, Vila Tibério, Ribeirão Preto, SP, venho requerer de V. Exa. avaliação do meu projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo do exopolissacarídeo Lasiodiplodana em ratos Wistar", bem como, emissão de Certificado, caso seja aprovado.

Nestes termos, pede deferimento.

Ribeirão Preto, 25 de Fevereiro de 2013.

Michela Bianchi de Mello

Maria de Lourdes Pires Bianchi

Recebi o original
Data 25/02/2013
Ass: