



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

ROBENILDO RONEY CASTRO CIRIACO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA,
GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DA SPIRULINA**

GOIÂNIA – GO

2018

ROBENILDO RONEY CASTRO CIRIACO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA,
GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DA SPIRULINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis.

GOIÂNIA – GO

2018

C578a Ciriaco, Robenildo Roney Castro

Avaliação das atividades angiogênicas, antiangiogênicas, genotóxica e antígenotóxica da Spirulina [recurso eletrônico] / Robenildo Roney Castro Ciriaco.-- 2018.

43 f.: il.

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2018

Inclui referências, f. 37-41

1. Neovascularização. 2. Toxicologia genética. 3. Nucleolo. 4. Cianobactéria. I.Reis, Paulo Roberto de Melo. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 575(043)

582.232(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 13 DE DEZEMBRO DE 2018 E CONSIDERADA

Aprovado PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Presidente)

2)

Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida / UEG (Membro Externo)

3)

Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás (Membro)

4)

Prof. Dr. Rogério José de Almeida / PUC Goiás (Suplente)

Dedico este trabalho especialmente à minha família, influenciadores e responsáveis por mais uma vitória de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado essa oportunidade e abençoado sempre minha trajetória.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou nas minhas decisões em especial meus pais, Eunildo Duarte e Vilma de Castro, como também meus irmãos Lucas Renan e Lívia Karoline. Aos meus avós, exemplos para minha vida assim como aos meus tios e primos.

Agradeço imensamente à minha esposa Tainan Ramos que esteve ao meu lado em todos os momentos. A Oscar e Ângela e toda sua família que sempre me apoiaram.

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Roberto, que mesmo com as dificuldades de distância, entres outras, contribuiu imensamente durante a execução desse trabalho.

Aos meus colegas de viagem Kelly, Ana Luísa e, em especial, Ruy Azevedo que além de colega se tornou também um grande amigo.

Ao Centro Universitário UniFG que sempre incentivou em todo processo de formação e pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas e amigos da UniFG como também do Laboratório que ao coordenador do Laboratório Bruno, parceiros e incentivadores dessa etapa.

A todos meus amigos, colegas e professores do programa MCAS, em especial Maria Alice, Ana Paula, Lucas e Susy, que muito me ajudaram em todas as etapas. Obrigado também aos professores da banca examinadora, Profa. Dra. Flávia Melo e a Profa. Dra. Luciane Madureira.

Enfim, agradeço de coração, a todos que participaram direta ou indiretamente desse momento tão importante de minha formação.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”. (Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A Spirulina é uma cianobactéria, utilizada como produto natural pelo alto valor nutricional de proteínas, nutrientes e minerais. Essa alga possui diversos efeitos benéficos à saúde humana como, ação anti-hipertensiva, antioxidante e anti-hiperlipêmica. Atualmente, a Spirulina vem sendo considerada como um medicamento natural capaz de prevenir ou controlar algumas doenças. **Objetivo:** Avaliar o potencial angiogênico, antiangiogênico, citotóxico, genotóxico e antigenotóxico da Spirulina. **Metodologia:** foi realizado um estudo experimental através do teste de micronúcleo para avaliar a genotoxicidade e antigenotoxicidade. Foram utilizados camundongos tratados intraperitonealmente, com as doses de 1000 mg kg⁻¹, 500 mg kg⁻¹ e 250 mg kg⁻¹ da solução aquosa da Spirulina, no tempo de 24 horas. Para avaliar a antigenotoxicidade, utilizou-se as mesmas doses citadas anteriormente, concomitante com a doxirrubicina. Para avaliação da angiogênese e antiangiogênese foram utilizados ovos embrionados de galinha, testados também com as mesmas doses descritas anteriormente. Foi utilizada estatística descritiva, ANOVA e Tukey para análise dos resultados, através do programa BioEstat 5.0. **Resultados:** os resultados da avaliação da genotoxicidade a solução da *Spirulina* apresentou nas três concentrações atividade genotóxica. Quando testado o potencial antigenotóxico, o estudo evidenciou uma diminuição significativa na frequência micronúcleos em 4000 EPC, as frequências foram comparadas com o controle positivo considerando um $p > 0,05$, mostrando assim uma atividade antigenotóxica. Os resultados do ensaio de angiogênese indicaram que a solução da *Spirulina* nas três doses utilizadas, provocou uma diminuição significativa na área de porcentagem da rede vascular na membrana corioalantóides, quando comparados ao grupo controle positivo, demonstrando assim uma atividade antiangiogênica. **Conclusão:** Conclui-se que a solução da *Spirulina* apresentou atividade genotóxica, antigenotóxica e atividade antiangiogênica nas concentrações testadas e não apresentou atividade citotóxica nas concentrações testadas através da relação eritrócitos normocromáticos e eritrócitos policromáticos.

Palavras-chave: Angiogênese *Arthrospira maxima*, Citotoxicidade, Membrana Corioalantóide, micronúcleo.

ABSTRACT

Introduction: Spirulina is a cyanobacterium used as a natural product with high nutritional value of proteins and minerals. This algae has several beneficial effects on human health, such as antihypertensive, antioxidant and antihyperlipemic. Currently, Spirulina has been considered a natural drug to prevent and control some diseases.

Aim: To evaluate the angiogenic, antiangiogenic, genotoxic and antigenotoxic activity of *Spirulina*. **Methodology:** Mice were treated with doses of aqueous solution of Spirulina of 1000 mg/kg, 500 mg/kg or 250 mg/kg by the intraperitoneal route, and the effect genotoxicity and antigenotoxicity was evaluated by micronucleus test after 24 hours. To evaluate the antigenotoxicity the mice was injection using the same doses in association with the doxorubicina.. In addition, antigenic and angiogenic activity was evaluated using embryonated chicken eggs injected with the different Spirulina doses. Descriptive statistics, ANOVA and Tukey were used to analyze the results, by BioEstat 5.0 software. **Results:** For the genotoxicity tests using spirulina solution, genotoxic activity was demonstrated for all the doses tested. When tested for the antigenotoxic effect of the Spirulina solution, the study showed a significant decrease in micronucleus frequency in 4000 PCE compared to the frequencies of the positive control, considering a $p > 0.05$, which demonstrates antigenotoxic activity. The results of the angiogenesis assay demonstrated that the three injected doses of Spirulina solution induced a significant decrease in the percentage area of the vascular bundle in the chorioallantoic membrane compared to the control group, indicating an antiangiogenic activity. **Conclusion:** In conclusion, the Spirulina solution showed genotoxic, antigenotoxic and antiangiogenic activity, however it does not show cytotoxic activity at the concentrations tested by the ratio of normochromatic erythrocytes and polychromatic erythrocytes.

Keywords: *Arthrospira maxima*, Angiogenesis, Citotoxicidade chorioallantoic membrane, micronucleus.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Representação esquemática da angiogênese..... | 17 |
| Figura 2 – Representação esquemática da formação de micronúcleos na divisão celular..... | 20 |
| Figura 3 – Observação de eritrócitos policromáticos EPC e eritrócito normocromático micronucleado ENC, em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo. | 28 |
| Figura 4 – Visão da rede vascular nas MCAs de ovos embrionados de galinha após tratamento com solução da Spirulina e os controles..... | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Composição do Corante panótico..... | 25 |
| Tabela 2 – Avaliação da atividade genotóxica e citotóxica. Frequência de MN/4000 EPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com <i>Spirulina</i> em diferentes doses e controles | 29 |
| Tabela 3 – Avaliação da atividade antigenotóxica e citotóxica Frequência de EPCMN e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com DXR e de diferentes doses da <i>Spirulina</i> | 30 |
| Tabela 4 – Avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica. Médias e desvios padrões obtidos na mensuração da porcentagem de área vascularizada formados | 31 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | <i>Spirulina</i> | 15 |
| 2.2 | ATIVIDADE ANGIOGÊNICA E ANTIANGIOGÊNICA | 16 |
| 2.3 | ATIVIDADE GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA | 18 |
| 2.4 | TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS <i>IN VIVO</i> | 20 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 22 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 22 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 4.1 | OBTENÇÃO DA <i>Spirulina</i> | 23 |
| 4.2 | OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DA <i>Spirulina</i> | 23 |
| 4.3 | ANIMAIS DA EXPERIMENTAÇÃO..... | 23 |
| 4.4 | PADRONIZAÇÃO DO AMBIENTE | 24 |
| 4.5 | OVOS EMBRIONADOS DE GALINHA..... | 24 |
| 4.6 | REAGENTES E SOLUÇÕES | 24 |
| 4.6.1 | Solubilização das células..... | 24 |
| 4.6.2 | Corante | 25 |
| 4.6.3 | Doxorrubicina | 25 |
| 4.6.4 | Dexametasona | 25 |
| 4.6.5 | Regederm®..... | 25 |
| 4.7 | APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA | 25 |
| 4.8 | PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 26 |
| 4.8.1 | Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo | 26 |
| 4.8.2 | Teste da Angiogênese..... | 26 |
| 4.8.3 | Análise Citogenética..... | 27 |
| 4.8.4 | Análise estatística | 28 |
| 5 | RESULTADOS..... | 29 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA <i>Spirulina</i> PELO TESTE DE MICRONÚCLEO | 29 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA <i>Spirulina</i> PELO ENSAIO EM MCA | 30 |
| 6 | DISCUSSÃO | 33 |
| 7 | CONCLUSÕES | 36 |
| | REFERÊNCIAS | 37 |
| | ANEXOS | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A uso de plantas pelo homem como alimento e tratamento de doenças é conhecido desde a antiguidade. A utilização de plantas medicinais, incluindo os extratos, de uso popular como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na população brasileira (PEREIRA; CARDOSO, 2012). O emprego das práticas medicinais alternativas ou seja, uso de produtos naturais está presente em diversas partes do mundo, sendo que na França este percentual chegou a 75%, no Canadá 70% e nos EUA 42% e estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas no mundo utilizam medicina popular baseada na extração de princípios ativos das plantas, para o tratamento de diversas doenças (SMITH-HALL; LARSEN; POULIOT, 2012; ZENI et al. 2016).

A *Arthrospira maxima* é uma cianobactéria da família *Oscillatoraceae* que cresce nas águas alcalinas em áreas subtropicais e tropicais, incluindo América, Ásia e África Central onde é conhecida popularmente como *Spirulina* (SPR). Essa planta tem sido amplamente utilizada como fonte de alimentação pelo seu alto valor nutricional de proteínas, nutrientes e minerais. Além disso, a *Spirulina* possui efeito benéfico para a saúde humana, pois vários estudos têm demonstrado ações anti-hipertensivas, antioxidante e anti-hiperlipêmico (TORRES-DURAN; FERREIRA-HERMOSILLO; JUAREZ-OROPEZA, 2008). Outros trabalhos demonstraram melhora no tratamento da esteatose hepática, obesidade e doenças cardiovasculares, que hoje estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (CANDELARIA et al. 2017). Propriedades antígenotóxicas e anticarcinogênicas foram comprovadas em pesquisas realizadas *in vivo* e *in vitro* (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ et al. 2013).

Nos últimos anos, aumentou-se o interesse em avaliar o potencial antioxidante dos hidrolisados de proteínas e sua possível aplicação como alimentos funcionais e nutracêuticos (MARTINEZ-PALMA; MARTINEZ-AYALA; DAVILA-ORTIZ, 2015). Hoje, a *Spirulina* é considerada como produto natural, capaz de prevenir ou controlar doenças, fornecendo benefícios médicos e tem apresentado uma série de melhorias principalmente como na hipercolesterolemia, certas doenças inflamatórias, alergias, câncer, toxicidade ambiental e toxicidade induzida por drogas, doenças cardiovasculares entre outras patologias (CARDOSO et al. 2017).

Os efeitos anti-hiperlipêmicos da *Spirulina* têm sido demonstrados em animais roedores e a redução dos níveis de colesterol foi relatada pela primeira vez em ratos albinos por Devi e Venkataraman em 1983, logo depois, em camundongos em 1984, por Kato et al. No estudo com ratos, a suplementação com a *Spirulina* e uma dieta com altos teores de gordura e colesterol resultou em uma diminuição significativa no colesterol sérico total, LDL, VLDL, enquanto o HDL foi aumentado concomitantemente (DENG; CHOW, 2010; DEVI; VENKATARAMAN, 1983).

Estudos sobre os efeitos antioxidantes da *Spirulina* em humanos sugerem resultados positivos para a saúde, também para o desempenho físico devido à sua composição química com alta concentração proteica (LUCAS et al. 2017). O estresse oxidativo e a inflamação contribuem simultaneamente para a patogênese da aterosclerose, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e hipertensão. Por isso, agentes com atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória podem revelar-se benéficos no combate a doenças cardiovasculares (HERNANDEZ-LEPE et al. 2015).

Diversos trabalhos têm favorecido uma compreensão mais adequada dos mecanismos de carcinogênese. O processo de angiogênese que é a formação dos novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes, são estimulados por alguns fatores, e esses vasos são necessários para o fornecimento dos nutrientes e a oxigenação adequada para crescimento dos tumores (PINHO, 2017). A angiogênese se encontra em diversos processos fisiológicos como a menstruação, cicatrização de feridas e outros. Os casos patológicos como retinopatia diabética, artropatias crônicas, angiofibroma, glaucoma vascular, disseminação metastática, crescimento tumoral e desenvolvimento de placa de ateroma a neovascularização também está presente (GONZÁLEZ et al. 2000; SAFATLE et al. 2002).

As substâncias antimutagênicas podem ser classificadas ou divididas em desmutagênicos, substâncias com papel de proteção ao inativar as substâncias mutagênicas antes de atuarem sobre o DNA e, as substâncias bioantimutagênicos com capacidade de inibir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes a célula (KADA; MORITA; INOUE, 1978).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Spirulina*

A *Spirulina* é uma cianobactéria unicelular pertencente à família *Oscillatoraceae*, que geralmente cresce nas águas alcalinas da África, Ásia, América do Sul e também no México. É conhecida, pelo seu alto teor de proteína (60-70% em peso seco) e abundância de nutrientes essenciais, como carotenóides, vitaminas, minerais e aminoácidos de valor biológico e por isso durante séculos foi utilizada com suplemento dietético (GUTIÉRREZ-SALMEÁN; FABILA-CASTILLO; CHAMORRO-CEVALLOS, 2015; NAH et al. 2012).

No Brasil, o uso de produtos naturais tem se tornado cada vez mais frequente. O aumento na procura da *Spirulina* para utilização na redução de massa corpórea e peso é frequente em todo Brasil (ZENI et al. 2016). A atividade biológica da *Spirulina* e alguns de seus componentes tem sido objeto de várias pesquisas, com a finalidade de testar seus efeitos farmacológicos hipolipemiante e antioxidante (HERNANDEZ-LEPE et al. 2015; OLIVEIRA et al. 2013). A *Spirulina* possui vários efeitos benéficos para saúde, como a melhora do perfil lipídico, a redução da hipertensão arterial sistêmica, além de se mostrar eficaz no tratamento da desnutrição (LUCAS et al. 2017). Outros estudos em humanos e camundongos, mostraram que o consumo de *Spirulina* como suplemento dietético traz benefícios para a saúde na prevenção ou controle da, inflamação, câncer e doença cardiovascular (NAH et al. 2012).

Estudos anteriores demonstraram outras atividades da *Spirulina*, como inibidor da replicação viral, prevenção da anemia, doença hepática gordurosa e ainda propriedades hipoglicêmicas, e capacidade em diminuir a genotoxicidade induzida por drogas (TORRES-DURAN; FERREIRA-HERMOSILLO; JUAREZ-OROPEZA, 2008). A alta concentração proteica demonstra a viabilidade da aplicação desta fonte como enriquecimento nutricional dos alimentos. Na sua composição a *Spirulina* apresentou 59,5% proteínas, 7,0% de lipídios, 17,2% de carboidratos e 16,5% de cinzas, em base seca (LUCAS et al. 2017). Essa alga pelo seu alto valor nutricional, tem sido empregada também como ração animal, como fonte de proteínas, para melhorar a produção e qualidade da carne (FINAMORE et al. 2017).

Outra espécie, a *Spirulina platensis*, tem atraído consideravelmente interesse entre especialistas em aves, devido às suas elevadas propriedades nutricionais e funcionais, que podem ser benéficas para frangos de corte. O uso dessa espécie, demonstrou diminuir o número de *Escherichia coli* no intestino das aves, resultando no aumento da altura das vilosidades e, conseqüentemente, melhorando a capacidade de absorção dos intestinos de frangos de corte (SUGIHARTO, 2018).

2.2 ATIVIDADE ANGIOGÊNICA E ANTIANGIOGÊNICA

O conceito proposto inicialmente por Folkman, na década de 70, definia a angiogênese como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos capilares pré-existentes, envolvendo uma série de eventos: proliferação de células endoteliais, migração de células para pontos distais, realinhamento celular e a formação de vasos (BESSA et al. 2015).

A angiogênese está presente em vários processos fisiológicos como a menstruação, cicatrização de feridas e outros. Também aparece em casos patológicos como retinopatia diabética, artropatias crônicas, degeneração macular, inflamação crônica, angiofibroma, glaucoma vascular, disseminação metastática, crescimento tumoral e desenvolvimento de placa de ateroma (GONZÁLEZ et al. 2000; SAFATLE et al. 2002).

A angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos capilares, tem um importante aspecto dentro da pesquisa científica. Pode ocorrer anormalmente em tumores malignos, como pode ser observado na Figura 1. É válido destacar, que o processo de angiogênese, no qual, as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos que são necessários para o fornecimento dos nutrientes e a oxigênio, propiciando um crescimento célere dos tumores (PINHO, 2017).

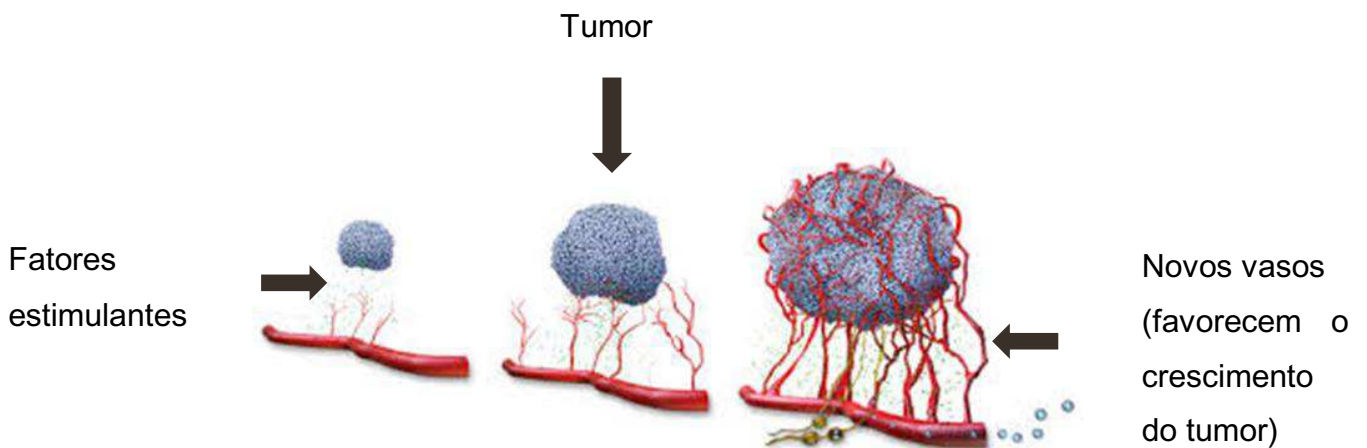


Figura 1 – Representação esquemática da angiogênese.
 Fonte: Adaptado SCIENCE OF CRC, 2018

Sabe-se, a muito tempo, que os tumores apresentam uma vascularização aumentada em relação aos tecidos normais. Esses achados foram sempre considerados como uma consequência do processo inflamatório decorrente das áreas focais de necrose existentes na massa tumoral. Hoje, existem evidências que a presença desta vascularização exacerbada é uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico, metástase e crescimento tumoral, e esse processo é chamado de angiogênese (CHUNG et al. 2017; PINHO 2017).

O processo da angiogênese envolve mecanismos de ativação, que acontece quando algum estímulo induz mudanças nas células epiteliais, passando de um estado de repouso para um estado de replicação e migração, com a formação de novos capilares, esse fenômeno pode ocorrer de forma fisiológica ou patológica. Por outro lado, existem fatores que atuam no sentido inverso à formação de novos capilares, sendo conhecido como antiangiogênicos (LIEKENS; CLERCQ; NEYTS, 2002).

Os fatores relacionados ao processo de angiogênese, anteriormente citados são: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e as metaloproteases (MMPs). O VEGF é responsável pela proliferação de células endoteliais e migração dessas células até locais onde haverá a formação de novos tubos capilares (VALIATTI et al. 2011), enquanto que, as MMPs regulam o processo de proteólise da matriz

extracelular e é responsável pelo remodelamento da matriz durante a angiogênese (LIU et al. 2017).

Recentemente, novas pesquisas têm dado ênfase ao estudo de substâncias provenientes de plantas que apresentam propriedades em estimular o aparecimento ou inibição desses novos vasos sanguíneos (ARAUJO et al. 2015; BESSA et al. 2015; MELO-REIS et al. 2010). O acúmulo de conhecimentos e estudos até o momento sobre a importância da angiogênese, como fator primordial no desenvolvimento tumoral, levaram à proposição de uma estratégia terapêutica anti-neoplásica, baseada no desenvolvimento de medicamentos derivados de plantas, capazes de proporcionar uma redução do crescimento tumoral (PINHO, 2017).

2.3 ATIVIDADE GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA

Genotoxicidade pode ser definida como a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos e essas alterações são responsáveis pelo surgimento de cânceres e doenças de ordem genéticas e hereditárias por meio de mutações gênicas, danos cromossômicos ou lesão no DNA (CARNEIRO et al. 2017; VALENTE et al. 2016).

Os medicamentos naturais e nutracêuticos são utilizados para a manutenção e a recuperação da saúde humana, isso desde os primórdios da existência humana até atualidade. Esses medicamentos são usadas desde as formas mais simples de tratamento tradicionais, como emplastro, chás e banhos até as formas mais sofisticadas a nível industrial (HAMILTON, 2004; LORENZI; MATOS, 2008).

Grande parte da população mundial pratica a automedicação, como exemplo, na Alemanha, a prevalência do uso irracional de medicamentos está em torno de 27,7%, em Portugal 26,2% de toda população (ARRAIS et al. 2016). Essa estimativa inclui a utilização das plantas medicinais, por fácil acesso e menor custo em comparação com os medicamentos sintéticos. Todavia, apesar da considerável carência de estudos clínicos a respeito das plantas medicinais comumente consumidas pela população, sabe-se que elas podem apresentar efeitos colaterais, não oferecendo, portanto, segurança no seu uso, podendo até levar a problemas mais graves como o caso genotoxicidade (LIMA et al. 2012). Estudos de genotoxicidade

são necessários por contribuírem com a utilização mais segura e eficaz de novas drogas ou de novos tratamentos (COMBES, 1992).

É notório que alguns compostos dos extratos vegetais podem causar doenças e até a morte por ação de agentes genotóxicos ou carcinogênicos. O interesse em determinar os riscos no uso medicinal desses extratos se explica por ações indesejáveis que os mesmo podem provocar. As mutações gênicas atuam em etapas do processo da carcinogênese humana, sendo assim, testes que detectam compostos genotóxicos permitem identificar substâncias que ofereçam esse risco (PAUMGARTTEN; CARNEIRO; OLIVEIRA, 2017; LUZ et al. 2012).

Neoplasia é um termo abrangente e descreve diversas doenças que são provocadas por células que se proliferam sem um controle adequado. Independentemente da exposição a um agente cancerígeno, as células também podem sofrer processos de mutações espontâneas em seus genes. Entretanto, o consumo de alguns medicamentos pode estar relacionado com surgimento de alguma neoplasia, por isso, há uma crescente preocupação em relação aos riscos do uso de algumas substâncias (SILVA et al. 2017).

A antigenotoxicidade, por sua vez, é a capacidade que têm algumas substâncias naturais ou sintéticas de proteger o DNA do dano ou modular a ação do agente genotóxico. Essas substâncias são conhecidas por agentes antigenotóxicos (WATERS et al. 1996).

A antigenotoxicidade inclui: a inibição da ativação de substâncias cancerígenas, a detoxificação de carcinógenos, o bloqueio da ligação carcinógeno ao DNA e a otimização de reparo do DNA (NAMASIVAYAM, 2011). Existem substâncias que apresentam propriedades antigenotóxica como os betas carotenos (Vitamina A), ácido ascórbico (Vitamina C), o tocoferol (Vitamina E) ácidos graxos essenciais e antioxidantes lipossolúveis (CHOOPANI et al. 2017; FINAMORE et al. 2017; MARTINS et al. 2017).

Substâncias antigenotóxicas têm despertado interesse na comunidade científica e também das indústrias farmacêuticas, pois esses agentes podem apresentar propriedades para a prevenção de danos ao DNA. Pesquisas sobre antigenotoxicidade apresentam potencial promissor, pois poderiam vir a elucidar a efetividade de algumas substâncias antigenotóxicas, encontradas nas plantas usadas na medicina popular (VEIGA JÚNIOR, 2008).

2.4 TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS *IN VIVO*

Dentre os testes de avaliação da genotoxicidade o ensaio de micronúcleo (MN) em medula óssea de roedores, aceito e recomendado pelas agências internacionais de pesquisa, inicialmente desenvolvido por Schmid (1976) é amplamente utilizado para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial, como um estudo toxicológico preliminar. Neste teste, é detectada a ação de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006; RIBEIRO et al. 2003).

O teste do MN pode ser realizado em qualquer população de células que esteja em constante divisão. Nesse caso, a medula óssea hematopoiética de mamíferos é indicada para o estudo, uma vez que as células levam de 10 a 24 horas para completarem um ciclo de divisão. A presença de micronúcleos pode ser pesquisada em eritrócitos policromáticos (EPC, eritrócitos jovens) ou eritrócitos normocromáticos (ENC, eritrócitos maduros) de medula óssea de camundongos, (MUTAGEN-BRASIL, 2018).

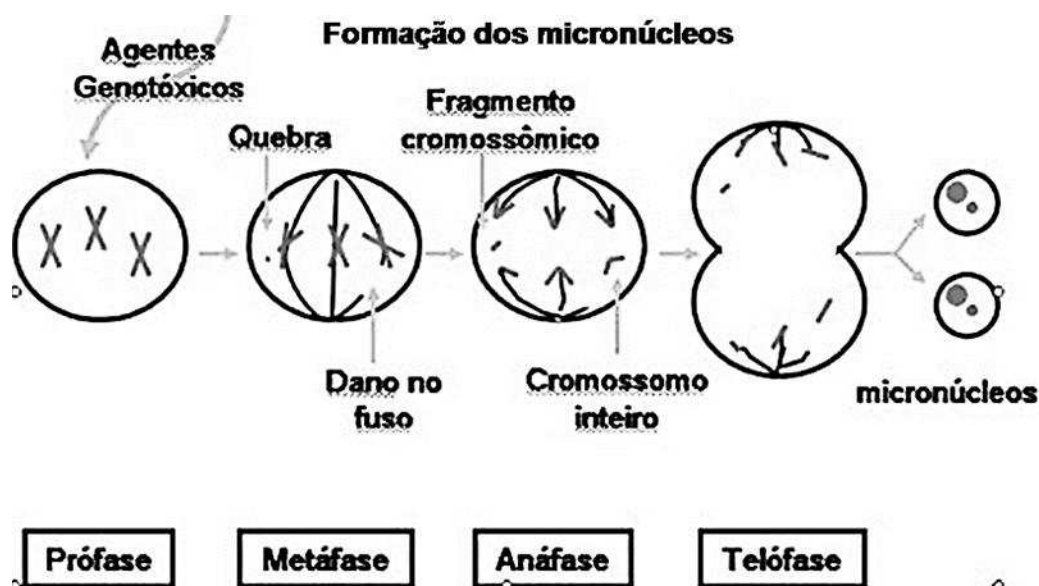


Figura 2 – Representação esquemática da formação de micronúcleos na divisão celular. Fonte: Adaptado de Andrade (2007).

Os micronúcleos são formados na anáfase, quando cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos se atrasam em relação aos elementos do centrômeros, quando estes se ligam aos polos do fuso. Após a telófase (última fase da divisão celular), os cromossomos não danificados e os fragmentos de centrômeros dão origem aos núcleos das novas células. Os elementos que se atrasam são também incluídos nas células filhas, mas muitos se transformam em núcleos secundários, muito menores que o núcleo principal, denominado micronúcleo (COSTA, 2011).

Esse teste da pesquisa do micronúcleo é um dos ensaios mais utilizados em avaliações genotóxicas, sendo bastante eficiente e permitindo a análise de uma grande número de células. Representa uma maneira simples, rápida, de baixo custo e precisa para estimar dano genético induzido, sendo assim utilizado como uma ferramenta aplicável para testar o efeito de compostos químicos sobre as células (RIBEIRO, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial angiogênico, antiangiogênico, citotóxico, genotóxico e antigenotóxico da *Spirulina*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade genotóxica da *Spirulina* mediante a realização de experimentos “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental o teste de micronúcleo.
- Investigar a atividade antigenotóxica da *Spirulina* mediante realização de experimentos “*in vivo*”, pelo tratamento com a solução da planta e um produto sabidamente genotóxico a Doxorrubicina utilizando-se o teste de micronúcleo.
- Avaliar o efeito citotóxico da *Spirulina*, através da relação eritrócitos normocromáticos e eritrócitos policromáticos.
- Investigar a atividade angiogênica da *Spirulina*, por meio da realização de testes laboratoriais “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental a Membrana corioalantóide (MCA) do ovo embrionado de galinha.
- Investigar a atividade antiangiogênica da *Spirulina*, por meio da realização de testes laboratoriais “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental a Membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA *Spirulina*

A *Spirulina* foi adquirida nas farmácias comerciais de Goiânia na apresentação em cápsula, fabricado pelo Laboratório Unilife Vitamins, com autorização do MS sob nº 6.02234-1.

4.2 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DA *Spirulina*

A solução aquosa foi obtida por diluição com água destilada da cápsula de *Spirulina*, onde foram aplicadas as seguintes doses: 1000 mg kg⁻¹, 500 mg kg⁻¹ e 250 mg kg⁻¹.

4.3 ANIMAIS DA EXPERIMENTAÇÃO

Para realizar o teste do micronúcleo, foram utilizados 40 camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* "outbred", linhagem Swiss Webster, oriundos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, apresentando peso corpóreo entre de 30 a 40 g e faixa etária entre 45 a 60 dias. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha previamente esterilizada, conforme padrões internacionais e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (DAMY et. al. 2010).

Os animais foram acomodados em ambiente com temperatura média de 24 ± 2 °C e umidade relativa de 55 ± 5 %; com ciclo de claro-escuro de 12 horas e tiveram água e alimentação *ad libitum*.

4.4 PADRONIZAÇÃO DO AMBIENTE

Os animais foram adaptados ao espaço físico do Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, situado na Rua 232, Nº 128 – Setor Universitário – Área V – 3º andar, sala 5 (Próximo a Praça Botafogo) CEP 74605-140, Goiânia – GO.

A adaptação dos animais ao ambiente proposto, proporcionou o bem-estar, de forma que as gaiolas ficaram próximas umas das outras para diminuir o estresse entre os animais.

A luminosidade, a temperatura, a intensidade de ruído e a umidade relativa do ar foram as do ambiente geral.

4.5 OVOS EMBRIONADOS DE GALINHA

Foram analisadas 60 membranas corioanlantióides do ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e também no Laboratório de Análises Clínicas da UniFG. Os ovos foram obtidos da granja Carrapicho, distrito de Guirapá, Pindaí-Bahia.

4.6 REAGENTES E SOLUÇÕES

4.6.1 Solubilização das células

- Soro fetal bovino de Laborclin Produtos para Laboratórios.

4.6.2 Corante

Tabela 1 – Composição do Corante panótico

| Categoria | Composição |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Instant Prov I | Solução alcoólica de ciclohexadienos à 0,1 % |
| Instant Prov II | Solução aquosa de azobenzenosulfônico à 0,1%; estabilizante I à 3%; conservante à 0,26% |
| Instant Prov III | Solução alcoólica de fenotiazinas à 0,1%; estabilizante à 1,5%; conservante à 0,26% |

4.6.3 Doxorrubicina

Controle indutor da formação de micronúcleos (substância genotóxica). Solução injetável na concentração .2mg/mL - Laboratório Tecnofarma, Validade 22/2020

4.6.4 Dexametasona

Controle inibidor da angiogênese. Solução de Dexametasona injetável, na concentração de 4mg/mL – Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº: 1511880, validade em dezembro de 2018.

4.6.5 Regederm®

Controle indutor da angiogênese: Regederm® - Pele Nova Biotecnologia, Lote nº: 00134061, validade em outubro de 2018.

4.7 APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

O presente trabalho teve a avaliação e a aprovação da Comissão Ética em Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo n. 2989240817, de 07/03/2018,(Anexo 1).

4.8 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.8.1 Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo

Foram utilizados cinco grupos de camundongos, cada grupo foi constituído por cinco animais. Três desses grupos foram tratados intraperitonealmente, com as doses de 1000, 500 e 250 mg kg⁻¹ do solução aquosa da *Spirulina*, por um período de 24 horas. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu 2 mg kg⁻¹ de doxorrubicina. Todos esses grupos foram utilizados para testar a genotóxicidade. Outros três grupos com cinco animais cada um foram usados para a avaliar a antigenotoxicidade, e receberam intraperitonealmente, doses de 1000, 500 e 250 mg kg⁻¹ da solução aquosa da *Spirulina*, concomitantemente com doses de 2 mg kg⁻¹ de DXR. Os mesmos controles positivos e negativos foram usados para esse teste.

Após 24 horas, os camundongos foram submetidos à anestesia geral com Tiopental (30 mg kg⁻¹), em seguida, a eutanásia por deslocamento cervical. Os fêmures dos animais foram retirados. As epífises do fêmur foram seccionadas e a medula óssea lavada com 1 ml de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, a mesma foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos e o sobrenadante, parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta de Pasteur. Uma gota da suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi confeccionado o esfregaço das células da medula óssea hematopoiética. Após a secagem as lâminas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução Corante de Panótico Instant Prov, por um período de 2 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. A confecção dos esfregaços e contagens das lâminas foram realizadas pelo procedimento “duplo-cego”.

4.8.2 Teste da Angiogênese

Os ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática à temperatura de 37°C e com umidade entre 60 e 70%, durante dezesseis dias de incubação. No quinto dia de incubação foi realizado, na casca do ovo, uma abertura

circular, com auxílio da micro-retífica Dremel. Este procedimento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta.

Em seguida, após a realização da abertura da casca do ovo, foi depositado uma gota (NaCl 0,9%) para facilitar a exposição da MCA (membrana corioalantóide) já vascularizada. Posteriormente, a abertura foi vedada com fita adesiva e o ovo foi novamente incubado.

Ao final do 13º dia de incubação foram utilizados discos de papel filtro, veiculando as soluções a serem testadas (*Spirulina*), controles (negativo, indutor, inibidor). Utilizou-se como controle negativo (água destilada), controle inibidor (dexametasona) e controle positivo (Regederm®). As redes vasculares das membranas foram analisadas após 72 horas de tratamento dos controles e teste (MELO-REIS et al. 2010). Tendo sido os mesmos depositados diretamente sobre a membrana. Todos os ovos voltaram para a incubadora até o 16º dia, quando foram, por fim, retirados. Todas as MCAs foram cortadas e retiradas dos ovos e em seguida depositadas em placas de Petri preenchidas com solução de formol (3,7 % v/v) por 5 minutos.

Na etapa seguinte, foram obtidas fotografias por equipamento digital, em tamanho 640x480 pixels e formato de RGB 24 bits, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular (WILTING et al.1992). Os resultados obtidos da rede vascular formada nas MCAs foram analisadas com o *software* Image J a partir porcentagem de área vascularizada e comparadas grupos controles e teste.

4.8.3 Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum Nikon, com a finalidade de detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 4.000 EPC por lâmina (Figura 3). Foi utilizada a média das duas lâminas como resultado. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados eritrócitos policromáticos (EPC) e

eritrócitos normocromáticos (ENC). A relação entre EPC/ENC foi determinada conforme Schmid (1975).

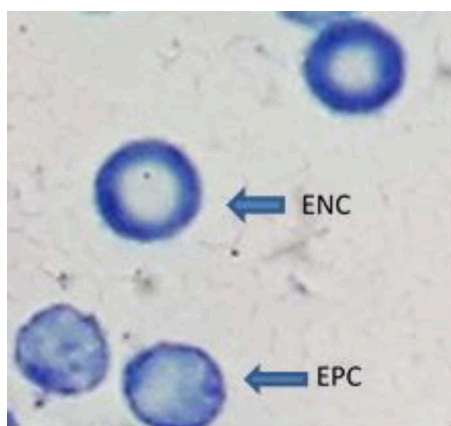


Figura 3 – Observação de eritrócitos policromáticos EPC e eritrócito normocromático micronucleado ENC, em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo. Fotomicrografia obtida por câmera 13MP Samsung ao microscópio Nikon utilizado para as análises.

4.8.4 Análise estatística

As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 4.000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de análise de variância (ANOVA) e todos os pares comparados pelo teste de Tukey. Os resultados da MCAs foram comparados em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de análise de variância (ANOVA) e também por estatística descritiva. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Foi utilizado para avaliar a normalidade dos grupos o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises foram realizados pelo *software* BioEstat 5.0 (AYRES, 2007).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA *Spirulina* PELO TESTE DE MICRONÚCLEO

A frequência de micronúcleos contados em 4000 EPC, foi usada para avaliar a genotoxicidade, os resultados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da atividade genotóxica e citotóxica. Frequência de MN/4000 EPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com *Spirulina* em diferentes doses e controles

| Dose <i>Spirulina</i> (mg kg ⁻¹ peso corporal) | Nº de animais | Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) (média ± DP) | Relação EPC/ENC (média ± DP) |
|--------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1000 | 5 | 23,2 ± 2,16 ^b | 0,94 ± 0,15 ^c |
| 500 | 5 | 15 ± 1,22 ^b | 0,80 ± 0,07 ^c |
| 250 | 5 | 12,8 ± 1,48 ^b | 0,92 ± 0,22 ^c |
| H ₂ O (controle negativo) | 5 | 4 ± 1,41 ^a | 0,86 ± 0,05 ^c |
| DXR (controle positivo) | 5 | 40,2 ± 6,14 | 0,42 ± 0,08 |

^a p > 0,05 ; ^b p < 0,05; ^c p > 0,05; ^d p < 0,05.

Todos os resultados foram comparados com o grupo controle negativo. O valor de p menor de 0,05 (p < 0,05) foram considerados indicativos de significância.

Na Tabela 2 observa-se que as todas as doses da solução da *Spirulina* de 1000 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹ e 250 mg kg⁻¹ apresentaram atividade genotóxica. Houve diferenças significativas (p < 0,05) na frequência de EPCMN quando comparadas ao grupo controle negativo. Já a relação EPC/ENC, para avaliar a citotóxicidade, quando comparada com o controle negativo não apresentou diferença significativa (p > 0,05) para as três doses testadas.

A Tabela 3 representam os resultados da frequência de EPCMN, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para avaliar a atividade antigenotóxica.

Tabela 3 – Avaliação da atividade antígeno-tóxica e citotóxica Frequência de EPCMN e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com DXR e de diferentes doses da *Spirulina*

| Dose <i>Spirulina</i> (mg kg ⁻¹ DXR) | Nº de animais | Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) (média ± DP) | Relação EPC/ENC (média ± DP) |
|----------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1000 + 2 | 5 | 14,4 ± 4,39 ^b | 0,82 ± 0,08 ^d |
| 500 + 2 | 5 | 11,6 ± 1,14 ^b | 0,84 ± 0,11 ^d |
| 250 + 2 | 5 | 11 ± 1,87 ^b | 0,74 ± 0,16 ^d |
| H ₂ O (controle negativo) | 5 | 4 ± 1,41 | 0,86 ± 0,05 |
| DXR (controle positivo) | 5 | 40,2 ± 6,14 ^a | 0,42 ± 0,08 ^c |

^a p>0,05; ^b p<0,05; ^c p>0,05; ^d p<0,05.

Todos os resultados foram comparados com o Grupo controle positivo.

Os valores de p menor que 0,05 (p<0,05) foram considerados significativos.

Nos dados da tabela acima, observa-se os resultados do tratamento concomitante da *Spirulina* nas dosagens de 1000 mg kg⁻¹, 500 mg kg⁻¹ e 250 mg kg⁻¹ mais 2 mg kg⁻¹ de doxorrubicina. Todos os grupos apresentaram diferenças significativas (p<0,05) quando comparados ao grupo controle positivo, significando que a *Spirulina* apresenta, também, potencial antígeno-tóxico. A relação de EPC/ENC comparadas ao controle positivo apresentou diferenças significativas (p<0,05) para as três doses testadas significando não possuir potencial citotóxico. Na tabela 2 os dados testados, não apresentou diferença significativa e na tabela 3 é possível verificar nos dados testados que apresentou uma diferença significativa indicando assim que a substância não é citotóxica.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA *Spirulina* PELO ENSAIO EM MCA

Foram analisadas 10 MCAs por grupo, como pode ser observado na Tabela 4 e figura 4, para avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica da *Spirulina* nas concentrações de 1000 mg 500 mg e 250 mg.

Tabela 4 – Avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica. Médias e desvios padrões obtidos na mensuração da porcentagem de área vascularizada formados

| Identificação MCAs | Regederm® % | Dexametasona % | H ₂ O % | 1000 % | 500 % | 250 % |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|-------|-------|
| 1 | 42,39 | 17,1 | 33,59 | 27,22 | 22,79 | 21,7 |
| 2 | 44,18 | 13,6 | 31,92 | 21,73 | 28,88 | 18,77 |
| 3 | 49,18 | 12,4 | 40,3 | 31,5 | 21,92 | 23,57 |
| 4 | 50,39 | 17,15 | 34,5 | 34,0 | 27,54 | 17,53 |
| 5 | 55,2 | 12,8 | 34,59 | 24,01 | 21,29 | 21,4 |
| 6 | 42,22 | 13,48 | 34,59 | 28,21 | 27,54 | 16,16 |
| 7 | 49,13 | 13,48 | 25,8 | 24,2 | 22,57 | 21,36 |
| 8 | 56,65 | 9,88 | 32,38 | 34,7 | 25,18 | 22,80 |
| 9 | 49,14 | 12,11 | 28,2 | 24,2 | 19,31 | 19,29 |
| 10 | 43,72 | 15,41 | 29,3 | 25,29 | 21,59 | 17,55 |
| Média | 48,22 ^b | 13,74 ^c | 32,51 ^e | 27,5 | 23,86 | 20,01 |
| DP | 5,09 | 2,26 | 4,06 | 4,5 | 3,21 | 2,49 |

^a p>0,05; ^b p<0,05; ^c p>0,05; ^d p<0,05; ^e p>0,05; ^f p<0,05.

Todos os resultados foram comparados com o Grupo controle indutor, inibidor e neutro. Os valores de p menor que 0,05 (p<0,05) foram considerados significativos.

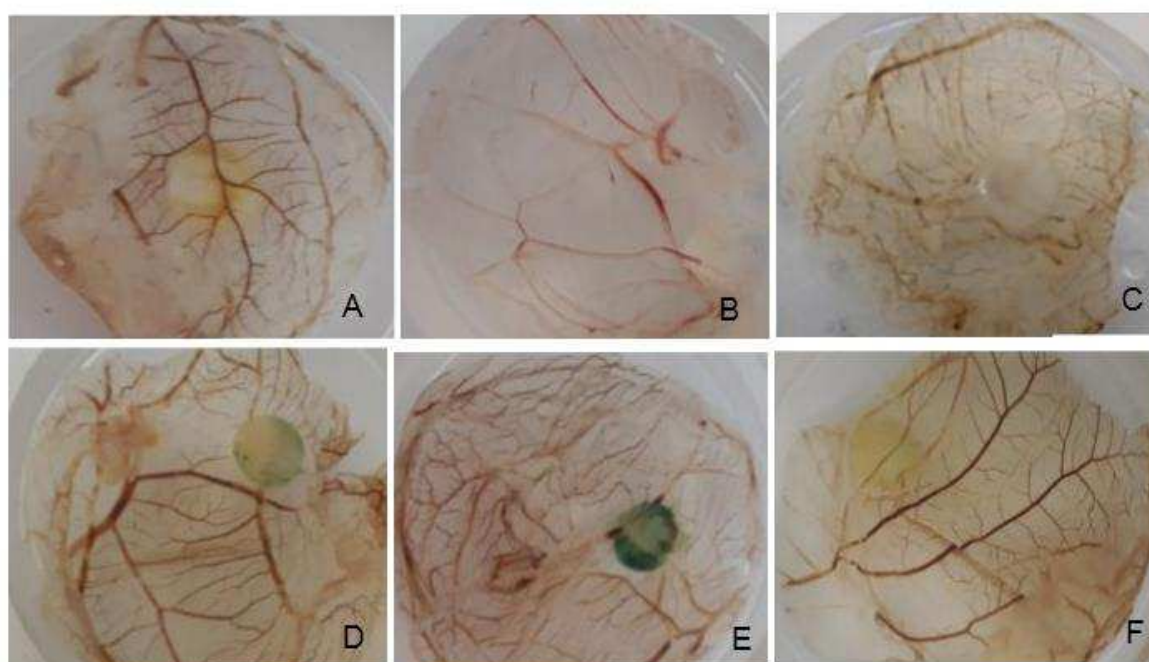


Figura 4 – Imagens da rede vascular nas MCAs de ovos embrionados de galinha após tratamento com solução da *Spirulina* e os controles. A – Regederm, B – Dexametasona, C – Água, D – SPR 1000, E – SPR 500, F – SPR 250.

O resultado do número de complexos que representa a média de vasos sanguíneos quantificados pelo *software Image J*, pode ser observado na tabela 4. As doses testadas da *Spirulina* quando comparadas aos controles negativo (água) e inibidor (dexametasona) apresentaram uma diferença não significativa ($p > 0,05$) mostrando assim que a *Spirulina* não possui potencial angiogênico.

Já em comparação com o controle positivo (Regederm) o resultado médio do número de vasos quantificados, demonstrou diferença significativa em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$), evidenciando assim uma capacidade antiangiogênica.

6 DISCUSSÃO

Na avaliação da genotóxicidade da solução aquosa da *Spirulina*, os resultados obtidos neste estudo, demonstraram efeito genotóxico em todas as concentrações testadas, em desacordo com estudos realizados com o mesmo objetivo que não detectaram toxicidade “aparente ao organismo” e não apresentarem riscos à saúde (FINAMORE et al. 2017; LEON, 2010; ROGATTO et al. 2004). Sendo que, outros experimentos utilizando solução da *Spirulina*, mais especificamente o componente β -caroteno chegaram a mostrar redução na formação de carcinoma bucal em hamsters (AMBROSI et al. 2008). Além disso, vários trabalhos demonstraram propriedades benéficas como capacidade antioxidante da *Spirulina*, por apresentarem compostos como ácidos fenólicos, tocoferóis e β -caroteno (FINAMORE et al. 2017; MIRANDA et al. 1998; TORRES-DURAN; FERREIRA-HERMOSILLO; JUAREZ-OROPEZA, 2008).

Na avaliação da antigenotóxicidade da solução aquosa da *Spirulina* os resultados obtidos neste estudo, evidenciaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle positivo (doxorrubicina). As doses utilizadas foram as mesmas citadas anteriormente para a teste de genotoxicidade associados a 2 mg kg^{-1} de Doxorrubicina. Isso comprova que a *Spirulina* nas dosagens testadas evidencia a atividade antigenotóxica dessa alga.

Esses resultados, apesar de parecer serem controversos, sugerem efeito genotóxico e antigenotóxico, podendo ser explicados pela presença de alguns constituintes químicos citados anteriormente (ácidos fenólicos, tocoferóis e β -caroteno) assim como a utilização de doses mais elevadas nesse trabalho (CARDOSO et al. 2017).

Esses resultados relacionados com a antigenotoxicidade da *Spirulina* corroboram outros trabalhos realizados que mostraram proteção ou melhora na toxicidade induzida pela cisplatina e pelo uretano e outras drogas (CARDOSO et al. 2017; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ et al. 2013; TORRES-DURAN, FERREIRA-HERMOSILLO E JUAREZ-OROPEZA, 2008). Uma das possíveis explicações para esse efeito protetor da *Spirulina*, seria uma redução significativa na extensão da peroxidação lipídica e um aumento concomitante dos antioxidantes enzimáticos do fígado e não enzimáticos por exemplo a glutathiona reduzida (DENG; CHOW, 2010).

Diversos compostos têm se destacado com características de proteção as células e também potencial antioxidante. Nas cionobactérias destacam-se os β -caroteno, carotenóides, clorofila e biliproteínas e a ficocianina. O principal pigmento da *Spirulina* ssp. é a ficocionina podendo ser considerado como pigmento fitoplanctônico singular. Em diversos países, esse pigmento é usado como suplemento alimentar, devido ao seu potencial nutracêutico, anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidante (CHU et al. 2010; DENG; CHOW, 2010). A presença da ficocianina no extrato utilizado, confirma o potencial protetor contra substâncias capaz de induzir o estresse oxidativo e de acordo o estudo de Chu et al. (2010) a *Spirulina* não causa efeito citotóxico para as células, corroborando assim com os resultados desse estudo.

Na avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa da *Spirulina* os resultados obtidos neste estudo, não demonstraram atividade angiogênica nas doses testadas. Diversas espécies de plantas tem apresentado atividade angiogênica testadas *in vivo* como *Aloe vera*, *Angélica sinensis*, *Dalbergia odorifera*, *Epimedium sagittatum*, *Patrinia villosa*, *Trichosanthes kirilowii*, *Hevea brasiliensis* e *Synadenium umbellatum* (BESSA et al. 2015; MELO-REIS et al. 2010; WANG et al. 2004).

Em relação a investigação da atividade antiangiogênica da *Spirulina*, esse trabalho evidenciou presença potencial antiangiogênico da solução aquosa da *Spirulina*, apresentando resultados relevantes quando comparado aos grupos controles positivo (Regederm) e negativo (Dexametasona) Isso pode demonstrar possível efeito benéfico da *Spirulina*, como substância adjuvante no tratamento de neoplasias, podendo ser explicado pela capacidade da substância em inibir o crescimento do tumor através da redução dos nutrientes e oxigenação, ou seja a redução da neovascularização, corroborando pesquisas realizadas *in vivo* e *in vitro* Álvarez-González et al. (2013). Em outro trabalho Ambrosi et al. (2008) demonstrou redução na formação do carcinoma bucal em hamsters pelo mesmo fator citado anteriormente.

A *Spirulina* mostrou suprimir o glioma o crescimento de células e também reduzir a angiogênese (KAWANISHI et al. 2012). Portanto, a *Spirulina* tem uma característica de reduzir a angiogênese parcialmente, por regulação da quantidade de IL-17 (Interleucina-17). A IL-17 que é uma citocina que participa no processo de mediadores inflamatórios, recrutando neutrófilos para as áreas de infecção e que

supostamente, promove a angiogênese, (KAWANISHI et al. 2012; NORMANTON; MARTI, 2013).

Em outros trabalhos apenas alguns compostos presentes na *Spirulina* como carotenoides, β -caroteno e a ficocianina, foram testados e mostraram propriedades anticarcinogênicas por apresentarem efeito antiangiogênico (FINAMORE et al. 2017; FERRARI; TORRES, 2002; MIRANDA et al.1998; TORRES-DURAN; FERREIRA-HERMOSILLO; JUAREZ-OROPEZA, 2008).

A antiangiogênese portanto é uma estratégia terapêutica anti-neoplásica, que vem sendo, cada vez mais estudada, baseada no desenvolvimento de substâncias capazes de inibir o crescimento célere dos tumores (PINHO, 2017; SEYIDOGLU et al. 2017).

7 CONCLUSÕES

Através dos métodos aplicados neste estudo, os resultados permitiram concluir que a solução aquosa da *Spirulina* apresentou atividade genotóxica nas concentrações testadas. A solução aquosa da *Spirulina* apresentou atividade antigenotóxica nos tratamentos concomitantes com a doxorrubicina, mostrando diminuição na frequência dos micronúcleos em 4000 EPC. O solução aquosa da *Spirulina* não apresentou atividade citotóxica nas concentrações testadas através da relação eritrócitos normocromáticos e eritrócitos policromáticos.

O solução aquosa da *Spirulina* não demonstrou atividade angiogênica, nas concentrações testadas. O solução aquosa da *Spirulina* apresentou potencial antiangiogênico nas concentrações testadas.

Conclui-se que a *Spirulina* é uma substância que possui diversos efeitos benéficos para a saúde humana e com possível grau de segurança quando utilizada nas dosagens recomendadas. E poderá ser utilizada concomitante para tratamento do câncer, reduzindo dos efeitos dos quimioterápicos e a angiogênese.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I. et al. Effect of *Spirulina maxima* and its protein extract on micronuclei induction by hydroxyurea in pregnant mice and their fetuses. **J. Med. Food**, v. 16, n. 11, p. 992–996, 2013.
- AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 109–117, 2008.
- ANDRADE, V. M. **Avaliação dos efeitos da poluição em duas espécies de peixes dos rios Tramandaí e Mampituba (RS) através do teste de micronúcleos e ensaio cometa**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- ARAUJO, L. A. et al. Angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil. **Sci. Med.**, v. 25, n. 2, p. 1–7, 2015.
- ARRAIS, P. S. D. et al. Prevalência da automedicação no Brasil e fatores associados. **Rev Saúde Pública**, Fortaleza, v. 50, n. 2, p. 1-11, jan./fev. 2016.
- AYRES, M. et al. **Software bioestat, aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 4. ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá/MCT/CNPQ, 2007.
- BESSA, G. et al. Angiogenic activity of latex from *Euphorbia tirucalli* Linnaeus 1753 (Plantae, Euphorbiaceae). **Braz. J. Biol.**, v. 75, n. 3, p. 752–758, 2015.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amaz.**, v. 36, n. 3, p. 357–364, 2006.
- CANDELARIA, P. V. et al. Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. **World J. Clin. Oncol.**, v. 8, n. 2, 2017.
- CARDOSO, R. V. C. et al. Development of nutraceutical formulations based on the mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*. **Food Funct.**, v. 8, n. 6, 2017.
- CARVALHO, L. F. de et al. Novel food supplements formulated with *Spirulina* to meet athletes' needs. **Braz. Arch. Biol. Technol**, Rio grande do sul, v. 61, n.11, p. 1-11, fev. 2018
- CARNEIRO, A. B. A. et al. Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorubicina: modelo experimental *in vivo*. **Acta Paul. Enferm.**, v. 30, n. 3, p. 233–239, 2017.
- CHOOPANI, A. et al. Spirulina: A Source of Gamma-linoleic Acid and Its Applications. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, Tehran, Iran, v. 3, n. 4, p. 483-488, nov./fev. 2017.

- CHU, W. et al. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 10, n. 53, p. 1–8, 2010.
- CHUNG C. H. et al. Aggretin Venom Polypeptide as a Novel Anti-angiogenesis Agent by Targeting Integrin alpha2beta1. **Sci Rep.**, v. 7, p. 2–11, 2017.
- COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chem. Ind.**, v. 24, p. 950–954, 1992.
- COSTA, P. A. **Avaliação do efeito tóxico de sulfato de alumínio e sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (siluriforme)**. 2011. 130 f. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal do Paraná, 2011.
- DAMY, S. B. et al. Aspectos Fundamentais da Experimentação Animal – Aplicações em Cirurgia Experimental. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 1 p. 103–111, 2010.
- DENG, R.; CHOW, T.; Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. **Cardiovasc Ther.**, v. 28, n. 4, p. 1–23, 2011.
- DEVI, M. A.; VENKATARAMAN, L. V. Hypocholesterolemic effect of blue-green algae *Spirulina platensis* in albino rats. **Ann. Nutr. Reports Int.**, v. 28, p. 519–530, 1983.
- FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 48, n. 3, p. 375–382, 2002.
- FINAMORE, A. et al. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, p. 1–13, 2017.
- FOLKMAN, J. The vascularization of tumors. **Sci. Am.**, v. 234, n. 5, p. 58–64, 1976.
- FOLKMAN, J.; INGBER, D. Inhibition of angiogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 3, n. 2, p. 89–96, 1992.
- GONZÁLEZ, R. P. et al. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cir. Bras.**, v. 15, n. 2, 2010.
- GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G.; FABILA-CASTILLO, L.; CHAMORRO-CEVALLOS, G. Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (Arthrospira). **Nutr. Hosp.**, México, v. 32, n. 1, p. 34-40, mar./abr. 2015.
- HAMILTON, A. C. Medicinal plants, conservation and livelihoods. **Biodivers. Conserv.**, v. 13, p. 1477–1517, 2004.
- HERNANDEZ-LEPE, M. A. et al. *Spirulina* y su efecto hipolipemiante y antioxidante en humanos: una revisión sistemática. **Nutr. Hosp.**, v. 32, n. 2, p. 494–500, 2015.

- KADA, T., MORITA, K., INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutat. Res.**, v. 53, p. 351–353, 1978.
- LEON, I. A. A. **Estudo do cultivo da *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio.** 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia bioquímica-farmacêutica) – Universidade de São Paulo, 2010.
- LIEKENS, S.; CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, n. 3, p. 253–270, 2001.
- LIMA, S. C. D. S. et al. Representações e usos de plantas medicinais por homens idosos. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 20, n. 4, p. 1–8, 2012.
- LIU, C. T. et al. Davallia bilabiata exhibits anti-angiogenic effect with modified MMP-2/ TIMP-2 secretion and inhibited VEGF ligand/receptors expression in vascular endothelial cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 196, p. 213–224, 2017.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008.
- LUCAS, B. F. et al. Effect of *Spirulina* addition on the physicochemical and structural properties of extruded snacks. **Food Sci. Technol. (Campinas)**, v. 37, p. 16–23, 2017.
- LUZ, A. C. et al. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 14, n. 635, p. 635–642, 2012.
- MARTINEZ-PALMA, N.; MARTINEZ-AYALA, A.; DAVILA-ORTIZ, G. Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) obtained by simulated gastrointestinal digestion. **Rev. Mex. Ing. Quím.**, v. 14, p. 25–34, 2015.
- MARTINS, R. G. et al. New technologies from the bioworld: selection of biopolymer-producing microalgae. **Polímeros**, Rio grande do sul, v. 24, n. 4, p. 285-289, out./dez. 2017.
- MELO-REIS, P. R. et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 1, p. 189–194, 2010.
- MIRANDA, M. S. et al. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 8, p. 1075–1079, 1998.
- MUHAMMADA, H. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. **J. Ethnopharmacology**, v.133, p. 647–653, 2011.
- MUTAGEN-BRASIL. Associação brasileira de mutagênese e genômica. Disponível em: <<http://mutagen-brasil.org.br/sobre/>>. Acesso em: 19 ago. 2018.
- NAH, W. et al. Effect of *Spirulina maxima* on spermatogenesis and steroidogenesis in streptozotocin-induced type I diabetic male rats. **Food Chem.**, n. 134, p. 173–179, 2012.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animal. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1215, p. 60–71, 2011.

NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 2, p. 237–246, 2013.

OLIVEIRA, C. A. et al. Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria spirulina Nutritional, functional and therapeutic potential of cyanobacterium spirulina. **RASBRAN**, Viçosa., v. 5, n. 1, p. 52-59, jan./jun. 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **J. Biotec. Biodivers.**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Rev. Bras. Colo-Proctol.**, v. 24, n. 4, p. 396–406, 2017.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; CARNEIRO, M. R. G.; OLIVEIRA, A. C. A. X. The impact of tobacco additives on cigarette smoke toxicity: a critical appraisal of tobacco industry studies. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 41-59, jul./set. 2017.

RIBEIRO, L. R. **Teste do micronúcleo em medulla óssea de roedores *in vivo***. In: Mutagênese Ambiental. Editora ULBRA, p. 173-200, 2003.

ROGATTO, G. P. et al. Influência da ingestão de *eSpirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n. 4, p. 258–263, 2004.

SAFATLE, A. M. V. et al. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, n. 4, p. 189–195, 2002.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 9–15, 1975.

SCIENCE OF CRC. Helping you take part in batter care. Disponível em: <<https://www.scienceofcrc.org/treat/>>. Acesso em: 22 set. 2018.

SEYIDOGLU, N. et al. The effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) and *Saccharomyces cerevisiae* on the distribution and cytokine production of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in rabbits. **Austral J. Vet. Sci.** Turkey, v. 49, n. 3, p. 185-190, mai./jul. 2017.

SILVA, S. C.; SANTOS, J. C.; ORSOLIN, P. C. Efeito redutor do Viagra (Citrato de Sildenafil) sobre a frequência de tumores epiteliais induzidos pela Doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 50, n. 6, p. 365–370, 2017.

SMITH-HALL, C. LARSEN, H.O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v. 8, p. 43, 2012.

SUGIHARTO, S. et al. Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler chicks. **S. Afr. J. Anim. Sci.**, v. 48, n. 1, p. 99–107, 2018.

TORRES-DURAN, P. V., FERREIRA-HERMOSILLO, A., JUAREZ-OROPEZA, M. A. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: a preliminary report. **Lipids Health Dis.**, v. 6, n. 33, p. 1–8, 2008.

VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Res. Bras. Saúde Ocup.**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-21, set./mar. 2016.

VALIATTI, F. B. et al. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55, n. 2, p. 106–113, 2011.

VEIGA JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 308–313, 2008.

WANG, S. et al. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. **Life Sci.**, v. 74, n. 20, p. 2467–2478, 2004.

WATERS, M. D. et al. Activity profiles of antimutagens: in vitro and *in vivo* data. **Mutat. Res.**, v. 350, n. 1, p. 109–129, 1996.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciênc. Saúde Colet.** Blumenau, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, set./fev. 2016.

ANEXOS

Anexo 1- certificado de aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais protocolo n. 2989240817, de 07/03/2018



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA, GENOTÓXICA, ANTIGENOTÓXICA DA SPIRULINA", protocolada sob o CEUA nº 2989240817, sob a responsabilidade de **Robenildo Roney Castro Ciríaco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA/PUC GOIÁS) na reunião de 06/03/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ACTIVITIES ANGIOGENIC, ANTIANGIOGENIC, GENOTOXIC, ANTIGENOTOXIC SPIRULINE", utilizing 48 Heterogenic mice (48 males), protocol number CEUA 2989240817, under the responsibility of **Robenildo Roney Castro Ciríaco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Pontifical Catholic University of Goiás (CEUA/PUC GOIÁS) in the meeting of 03/06/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **12/2018**

Área: **Ciências Ambientais E Saúde**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **45 a 60 dias**

N: **48**

Linhagem: **Mus musculus / SwissWebster**

Peso: **30 a 40 g**

Resumo: A *Arthrospira maxima* é da classe cianobactéria e é conhecida no meio popular como spirulina. Ela tem sido utilizada como fonte de alimentação pelo seu alto valor nutricional de proteínas, nutrientes e minerais. Vários estudos tem demonstrado ações, anti-hipertensivas, antioxidante e anti-hiperlipêmico. Tem apresentado diversos efeitos benéficos sobre uma série de doenças principalmente hipercolesterolemia e doença gordurosa do fígado. Hoje a Spirulina vem sendo considerada como um medicamento natural ou nutracêuticos capaz de prevenir ou controlar essas doenças. Objetivou-se nesse trabalho avaliar o potencial angiogênico, antiangiogênico, genotóxico, antigenotóxico da Spirulina (*Arthrospira maxima*). A investigação atividade angiogênica e antiangiogênica da Spirulina será realizada por meio de testes laboratoriais [in vivo], utilizando como modelo experimental a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha. Os teste de genotoxicidade serão realizados no modelo [in vivo], em camundongos através do teste de micronúcleos. Este teste pode ser usado para identificar possíveis danos cromossômicos induzidos por agentes genotóxicos. Tanto os resultados positivos de indução da atividade angiogênica quanto os de inibição da atividade angiogênica do extrato da Spirulina serão relevantes. No caso de identificada a presença da atividade angiogênica, esta poderá ser aplicada na terapêutica, induzindo a formação de tecido de granulação e também na cicatrização de feridas. O segundo caso, se detectada a presença da atividade antiangiogênica, este terá uma importante contribuição para a terapêutica antitumoral. Os resultados negativos dos testes de genotoxicidade podem contribuir para a utilização segura da Spirulina terapêuticamente.

Local do experimento: Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, situado na Rua 232, Nº 128 [Setor Universitário] [Área V] [3º andar, sala 5 (Próximo a Praça Botafogo) CEP 74605-140, Goiânia [GO.

Goiânia, 07 de março de 2018



Comissão de Ética no Uso de Animais

marta regina magalhães

Profa. Dra. Marta Regina Magalhães
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profa. Dra. Graziela Torres Blanch
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pontifícia Universidade Católica de Goiás