

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Camila Figueira Mendes

**EFEITO DOS COGUMELOS *AGARICUS BLAZEI* E *GANODERMA
LUCIDUM* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E
GESTACIONAL DE RATAS WISTAR**

**EFFECT OF *AGARICUS BLAZEI* AND *GANODERMA LUCIDUM*
MUSHROOMS ON THE EMBRYO AND GESTATIONAL DEVELOPMENT OF
WISTAR RATS**

Sorocaba/SP

2021

Camila Figueira Mendes

EFEITO DOS COGUMELOS *AGARICUS BLAZEI* E *GANODERMA LUCIDUM* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E GESTACIONAL DE RATAS WISTAR

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência o do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Sorocaba/SP

2021

Ficha Catalográfica

M49e Mendes, Camila Figueira
Efeito dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum*
sobre o desenvolvimento embrionário e gestacional de ratas wistar /
Camila Figueira Mendes. – 2021.
61 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de
Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. *Agaricus* (Cogumelo). 2. *Ganoderma lucidum*. 3.
Teratogênese. 4. Gravidez. I. Franco, Yoko Oshima, orient. II.
Universidade de Sorocaba. III. Título.

Camila Figueira Mendes

EFEITO DOS COGUMELOS *AGARICUS BLAZEI* E *GANODERMA LUCIDUM* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E GESTACIONAL DE RATAS WISTAR

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Universidade de Sorocaba

Profa Raquel de Mendonça Rosa Castro

Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Eric Diego Barioni

Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Edson Hideaki Yoshida

Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura

Pontifícia Universidade Católica de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar esta tese as seguintes pessoas e instituições:

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e sabedoria. Sou grata principalmente, pois sem ele, minha vida não seria possível.

Agradeço à Profa. Dra. Marli Gerenutti por ter aceitado me orientar e por ter se demonstrado uma excelente pesquisadora, empreendedora e mulher, um destaque em seu tempo. Obrigada por mesmo estando distante em diversos momentos, se manteve disposta a me ensinar e também me direcionar neste projeto. Obrigada por todas as ideias, dicas, desafios e finais de semanas que pude estar em sua companhia em diversos experimentos.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, por ter aceitado se tornar minha orientadora, no momento em que eu estava disposta a desistir de tudo. Obrigada por ler, reler, apontar erros, acertos e por me ensinar a ser melhor mais rápida e mais consciente. Obrigada por não ter me abandonado, até mesmo no momento que eu me abandonei e desisti, e agora posso dizer que essa etapa precisa de uma pessoa humana, calorosa e amiga.

Agradeço à minha mãe Julia Figueira e meu padrasto Mauro Florentino pelo incentivo, pelas críticas e por todos os momentos que me fortaleceram e me ensinaram todas as lições até aprendidas até o momento. Agradeço também por cuidar do meu filho de 4 patas Bento Leopoldo, o qual também sou muito grata pois foi ele quem ficou ao meu lado em diversos momentos.

Agradeço ao meu pai Dirceu Mendes e minha madrasta Cristiane Oliveira, por terem me apoiado nos momentos difíceis, por terem dado todo o subsídio para que eu pudesse alcançar esta etapa, afinal sem uma base construída, não chegamos longe, e cá estou!

Agradeço à Amanda Gonçalves dos Anjos, que caminhou comigo nos momentos mais felizes e também mais difíceis. Obrigada pela sua calma, olhar cuidadoso, parceria e palavras sábias ditas que eu não entendia no momento e que depois se tornaram claras e essenciais. Obrigada por caminhar comigo e não soltar minha mão, pois o caminho percorrido tendo seu suporte se tornou

mais tranquilo e feliz. Obrigada por me ensinar a ver além do meu mapa e do que meus olhos podem ver. Obrigada por ser você.

Agradeço à minha amiga e mestre Erika Caetano, por todos os momentos, conversas, finais de semana trabalhados, cursos e congressos realizados. Agradeço especialmente por me ajudar em momentos que eu não conseguiria ter tido acesso, sem você! Obrigada por todos os experimentos e toda dedicação que você teve. Obrigada por ter me recebido no grupo de pesquisa e ter se tornado uma amiga, que segurou minha mão nos momentos de alegria e tristeza.

Agradeço à minha amiga e em breve doutora Natália Tribuiani, por todas as aulas e créditos educativos que compartilhamos juntas, afinal muitas aulas não teriam sido tão divertidas sem sua presença e os nossos “bola-fora” juntas. Obrigada por atender aos telefonemas em qualquer hora do dia e da noite e por ouvir em silêncio todas as minhas angústias, medos, decepções e no final, me ajudar transformar todos em sentimentos em metas, e o mais importante concretizar estes.

Agradeço à Mariane Algaba, Bruna Alle e Hilton Kenji, por serem parceiros de trabalho e por me ajudar a manter a calma, o foco e conseguir conciliar uma vida de doutoranda com uma vida de profissional além das fronteiras da UNISO. Obrigada pela parceria e por podermos termos compartilhados histórias, momentos e ideias.

Agradeço à Camila Cortez por ser minha amiga de sempre e pra sempre, obrigada por compartilhar seu ponto de visto em todas nossas conversas, obrigada por ser uma pessoa leve, que transborda alegria e autenticidade.

Agradeço aos meus líderes Márcio Rodrigues, Gabriela Sismon, César Alexandre e Patricia Mendes por terem aberto espaço na minha agenda de trabalho para que eu pudesse cumprir créditos, aulas, e finalizar este projeto, obrigada por todo apoio, sem o auxílio, compreensão e a liderança de vocês, isto não seria possível.

Agradeço à Flávia Cardoso que mesmo dizendo não ser minha amiga (risos) é parte fundamental deste. Obrigada pela leitura do projeto, obrigada por me cobrir no trabalho quando eu precisava sair pra ver aulas, obrigada por me ensinar um pouco de microbiologia, obrigada por todas as discussões

científicas, por toda carinha feita e pelas que você ainda me deve, e finalmente obrigada por ser minha amiga, mesmo que não assumamos isso, afinal, não sorrimos pra qualquer um e assumir isso, arruinaria nossa reputação!

Agradeço à Maria Fernanda e Jennifer Piccoli (*in memoriam*) por terem me recebido de braços, por todos os cafés, brincadeiras, cuidados e principalmente por terem se tornados não apenas colegas de profissão, mas sim amigas que estiveram comigo em todos os momentos e transições. Obrigada por terem se permitido permanecer em minha vida mesmo a distância.

Agradeço à Patricia Helena e à Barbara pelo companheirismo, auxílio, ensinamentos, e por terem tornado minha rotina mais divertida durante minha passagem pelo IDS.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram a concluir este projeto.

Agradeço a agência de fomento Fapesp pelo apoio financeiro, que permitiu o desenvolvimento deste projeto. Agradeço à Uniso e à Capes por me proporcionarem a expansão de meus horizontes, e por terem me possibilitado concluir este trabalho.

“...Everybody got their reason
Everybody got their way
We're just catching and releasing
What builds up throughout the day.”

Matt Simons

RESUMO

A teratogenicidade caracteriza-se como a capacidade que um composto apresenta de provocar alterações congênitas, decorrentes da sua exposição durante a gestação. Por isso, o uso de substâncias durante a gestação deve seguir rigoroso controle para evitar danos ao concepto. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da administração diária de *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum* em ratas prenhas, por meio de testes pré-clínicos. Este projeto foi aprovado pelo Ceua/Uniso (Protocolo n. 089/2016). Cinco grupos (n=6, cada) foram formados aleatoriamente, sendo: controle salina (Cs), *A. blazei* (Ab_A), *A. blazei* (Ab_D), *G. lucidum* (Gl_A) e *G. lucidum* (Gl_D). Foram administrados diariamente, via gavagem, volume de 1,5 mL contendo doses de 100 mg/kg, de pó liofilizado de cada cogumelo dissolvido em solução salina no período de 19 dias de gestação. Igual volume de solução salina foi administrado ao grupo Cs. No 20º dia gestacional, as fêmeas foram anestesiadas e eutanasiadas. Amostras biológicas foram coletadas como: sangue, para as análises bioquímicas e hematológicas; rins e placenta para análises histológicas dos órgãos maternos; cornos uterinos, para análises morfométricas e morfológicas dos fetos. Não se observaram efeitos deletérios no perfil reprodutivo e gestacional perante a exposição aos cogumelos nos períodos de pré-implantação e implantação (1º ao 8º dia gestacional), porém o uso dos cogumelos no período organogenético (9º ao 19º) apresentou redução significativa do crescimento crânio-caudal, caudal e crânio (antero-posterior). Os parâmetros hematológicos contagem de leucócitos, contagem de hemácias, Hemoglobina, Hematócrito e Plaquetas analisados do grupo tratado não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Não foi observada hepatotoxicidade mensurada através das enzimas hepáticas, nem diferença significativa dos níveis de insulina e glicose, quando comparados ao controle. Houve redução plasmática de colesterol total e triglicérides. A administração oral de *A. blazei* e *G. lucidum* apresentou redução significativa do crescimento crânio-caudal (antero-posterior), porém em períodos diferentes pós-implantação, esta malformação pode ser causada por mecanismos diferentes. A exposição aos cogumelos não causou alteração no desenvolvimento gestacional e fetal. Não se observou modificação na morfologia do glomérulo renal materno, nem alteração na morfologia placentária, entretanto foi possível observar o aumento na quantidade de células produtoras de glicogênio quando a ocorre a exposição à *Ganoderma lucidum* anterior à implantação. Os cogumelos não demonstraram ação teratogênica e favoreceram o desenvolvimento da gestação e o crescimento normal do feto. Porém, a exposição deve ser realizada com cautela considerando o período gestacional e a quantidade utilizada.

Palavras-Chave: *Agaricus blazei*. *Ganoderma lucidum*. Gestação. Teratogênese.

ABSTRACT

Teratogenicity is characterized as the ability of a compound to cause congenital changes, resulting from its exposure during pregnancy. Therefore, the use of substances during pregnancy must follow strict control to avoid damage to the fetus. The objective of the work was to evaluate the effects of daily administration of *Agaricus blazei* and *Ganoderma lucidum* in pregnant rats, through pre-clinical tests. This project was approved by Ceua/Uniso (Protocol No. 089/2016). Five groups (n = 6, each) were randomly formed, being: saline control (Cs), *A. blazei* (AbA), *A. blazei* (AbD), *G. lucidum* (GIA) and *G. lucidum* (GID). A volume of 1.5 mL containing doses of 100 mg / kg of lyophilized powder from each mushroom dissolved in saline solution was administered daily via gavage during the 19-day gestation period. Equal volume of saline was administered to the Cs group. On the 20th gestational day, the females were anesthetized and euthanized. Biological samples were collected as: blood, for biochemical and hematological analysis; kidneys and placenta for histological analysis of maternal organs; uterine horns, for morphometric and morphological analyzes of fetuses. There were no deleterious effects on the reproductive and gestational profile when exposed to mushrooms in the pre-implantation and implantation periods (1st to 8th gestational day), but the use of mushrooms in the organogenetic period (9th -19th) showed a significant reduction in skull growth - caudal, caudal and skull (anteroposterior). The hematological parameters of leukocyte count, red blood cell count, Hemoglobin, Hematocrit and Platelets analyzed in the treated group did not show any statistically significant difference in relation to the control group. There was no hepatotoxicity measured through liver enzymes, nor significant difference in insulin and glucose levels, when compared to control. There was a plasma reduction in total cholesterol and triglycerides. The oral administration of *A. blazei* and *G. lucidum* showed a significant reduction in cranio-caudal growth (antero-posterior), however, at different post-implantation periods, this malformation may be caused by different mechanisms. Exposure to mushrooms did not change the gestational and fetal development. There was no change in the morphology of the maternal renal glomerulus nor in placental morphology, however it was possible to observe an increase in the glycogen-producing cells amount when exposure to *Ganoderma lucidum* occurs before implantation. The mushrooms did not show teratogenic action and favored the development of pregnancy and the normal growth of the fetus. However, exposure should be performed with caution considering the gestational period and the amount used.

Keywords: *Agaricus blazei*. *Ganoderma lucidum*. Pregnancy. Teratogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab _A	<i>Agaricus blazei</i> administrado no período de 1° ao 8° dia gestacional
Ab _B	<i>Agaricus blazei</i> administrado no período de 9° ao 19° dia gestacional
<i>A. blazei</i>	<i>Agaricus blazei</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Cs	Controle salina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Gl _A	<i>Ganoderma lucidum</i> administrado no período de 1° ao 8° dia gestacional
Gl _B	<i>Ganoderma lucidum</i> administrado no período de 9° ao 19° dia gestacional
<i>G. lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>
μM	Micromolar
RBC	Contagem total de eritrócitos
WBC	Contagem total de glóbulos brancos
PLT	Plaquetas
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
Col	Colesterol
Trig	Triglicerídeos

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1**– Ganho de peso materno e desempenho reprodutivo frente ao tratamento com cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum*-----30
- Tabela 2**– Avaliação das alterações estruturais em fetos de ratas Wistar tratadas com cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* (peso fetal ao nascimento, placenta, morfometria fetal e centros de ossificação no 20º dia de gestação-----32
- Tabela 3**– Perfil hematológico de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós implantacional-----36
- Tabela 4**– Perfil bioquímico de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós implantacional---
-----38
- Tabela 5**– Desempenho gestacional de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional-----41
- Tabela 6**– Determinação dos índices gestacionais de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional-----42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**– Administração diária dos cogumelos aos diferentes grupos de ratas prenhas-----26
- Figura 2**– Medidas dos aspectos anatômicos externos dos fetos-----28
- Figura 3**– Desempenho reprodutivo e gestacional frente à exposição materna aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum*-----31
- Figura 4**– Toxicologia fetal sob os parâmetros peso fetal ao nascimento, placenta, morfometria fetal e centros de ossificação no 20º dia de gestação-----33
- Figura 5**– Perfil hematológico e bioquímico de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional---37
- Figura 6**– Desempenho gestacional de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional-----39
- Figura 7**– Determinação dos índices gestacionais de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional-----43
- Figura 8**– Fotomicrografia de corte histológico renal de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional-----45
- Figura 9**– Área (μm^2) dos glomérulos renais de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós-implantacional-----46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Placenta e Teratogenicidade	16
2.2. Produtos Naturais Teratogênicos	19
2.3. Cogumelos Comestíveis.....	21
2.3.1. Cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	22
2.3.2. Cogumelo <i>Ganoderma lucidum</i>	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Delineamento do estudo.....	27
4.2. Aspectos legais	27
4.3. Pó liofilizado	27
4.4. Animais.....	28
4.4.1. Acasalamento, prenhez, exposição aos cogumelos e procedimento de cesárea	28
4.4.2. Avaliação do desempenho gestacional	29
4.5. Avaliação bioquímica materna	30
4.6. Avaliação hematológica materna	31
4.7. Avaliação morfológica fetal.....	31
4.8. Análise estatística	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Ganho de peso materno e desempenho reprodutivo	33
5.2. Toxicologia Fetal	35
5.3. Perfil hematológico e bioquímico materno.....	38
5.4. Avaliação do desempenho gestacional	44
5.5. Avaliação morfológica	45
5.6. Avaliação de alterações fisiológicas maternas	49
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO	61

1. INTRODUÇÃO

Conforme citado por Riquelme (2009) “a placenta é conhecida e estudada como um órgão que se interpõe entre a mãe e o feto tendo constituintes de ambos os organismos”. Este órgão possui duas funções amplamente conhecidas e estudadas como a nutrição e a proteção fetal (CETIN; ALVINO, 2009; CRIDER et al., 2009).

Enquanto o feto é pequeno, as trocas gasosas e nutricionais se dão por difusão. À medida que este se desenvolve, a placenta se organiza através de suas membranas formando assim, uma espécie de barreira, possibilitando a troca de nutrientes, gases e até mesmo substâncias maléficas à saúde fetal (HAGGARTY et al., 2002; ASSIS NETO et al., 2009). Esta barreira é capaz de atuar nesses intercâmbios biomoleculares através de diversos mecanismos complexos tais como, junções comunicantes, de oclusão e adesão e assim, permitirem a passagem de moléculas da interface materna para a interface fetal (GODFREY; BARKER, 2000; CRIDER et al., 2009).

A barreira placentária, contudo, pode não ser eficiente em determinadas situações. Alguns fármacos, plantas e fungos, por exemplo, administrados à mãe durante a gestação, podem também alcançar a corrente sanguínea fetal, podendo comprometer o organismo fetal como um todo principalmente por este não conter mecanismos de defesa desenvolvidos suficientemente (LEMONICA, 1996; HEITMANN; NORDENG; HOLST, 2013; LUNARDI; SCHUELTER; GALATO, 2014).

Agentes capazes de proporcionar dano ao feto ou embrião em determinado estágio de desenvolvimento do conceito, a organogênese, são denominados teratógenos. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos, dependentes da dose entre outros fatores, incluem morte celular programada, proliferação celular, tecidual e diferenciação celular. Como consequência pode-se atingir desde uma célula até o organismo como um todo provocando danos como a restrição do crescimento intrauterino até a morte embrionária/fetal (RAMOS et al., 1981; KALTER, 2003; CASTILHA; ORIOLI, 2004; MOORE; PERSAUD, 2008).

Em humanos, Moore e Persaud (2008) estimaram que, em média, 10% dos defeitos congênitos decorrem da ação perturbadora de drogas, vírus e outros fatores ambientais.

Muitas doenças são tratadas com produtos naturais, e até mesmo em situações normais, a população tem aumentado o consumo de chás, xaropes e até mesmo extrato de fungos. Os últimos, popularmente conhecidos como cogumelos, teriam por função atuar como agente nutricional, promovendo a melhoria do sistema imunológico (BAO et al., 2001; KIM et al., 2005; WASSER et al., 2005). Entretanto, em que pese o benefício sobre o consumo de cogumelos comestíveis, estudos sobre toxicidade são escassos (JO; HOSSAIN; PARK, 2014; GAWLIKOWSKI; ROMEK; SATORA, 2015) e geralmente estão relacionados aos casos acidentais.

Neste contexto, é de extrema importância analisar o impacto da administração oral e diária de cogumelos durante a gravidez, em modelo experimental utilizando ratas prenhas saudáveis, como ponto de partida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PLACENTA E TERATOGENICIDADE

A placenta é caracterizada pela justaposição de tecidos maternos e fetais para o propósito de troca fisiológica entre a mãe e o feto. Serve para a transferência de nutrientes e oxigênio para o embrião e feto em desenvolvimento, mas, além disso, tem também outras importantes funções endócrinas, secretoras e protetoras (CARTER; ENDERS, 2016).

A placenta é um órgão de forma discoide com 15–20 cm de diâmetro e 2–3 cm de espessura, composta por um componente fetal e um componente materno. O componente fetal é composto por todas as porções placentárias que se originam do blastocisto, incluindo o disco placentário, as membranas amnióticas e coriônicas e o cordão umbilical. O componente materno conhecido como decídua é derivado do endométrio materno (CARUSO; EVANGELISTA; PAROLINI, 2012).

A transferência de substâncias, oxigênio e nutrientes da circulação materna para o feto sangue (nutrição hemotrófica) e de produtos residuais do sangue fetal para o materno é realizado através da 'Barreira placentária', que é composta por células trofoblásticas, tecido sub-trofoblástico e paredes capilares fetais (KOREN; ORNOY, 2018).

A passagem de um fármaco pela placenta depende de vários fatores tais como ligação às proteínas plasmáticas, solubilidade de lipídios e constante de ionização (pKa). Entretanto, a exposição fetal a fármacos também depende da farmacocinética materna, incluindo o volume de distribuição, a taxa de metabolismo e excreção pela placenta, a diferença de pH entre os fluidos maternos e fetais e o efeito das alterações hemodinâmicas na mãe durante a gravidez (WERLER, 2014).

Os medicamentos são prescritos para 90% de todas as mulheres grávidas (BÉRARD, 2019). No entanto, ainda existe um sentimento de desconforto em torno deste tema, tanto entre os profissionais de saúde quanto entre as futuras gestantes.

A segurança do uso de medicamentos na gravidez sempre envolve dois indivíduos, a mãe e o feto. O feto em desenvolvimento considerado como "co-tratado" está em seu estágio mais vulnerável da vida. Ao contrário de crianças ou adultos, os efeitos colaterais que afetam o embrião não podem ser detectados com antecedência suficiente para evitar danos potencialmente ao longo da vida. Sendo assim, a segurança dos medicamentos na gravidez é de extrema importância (DATHE; SCHAEFER, 2019).

A terapia em pacientes grávidas é controlada através de classificação que categoriza os medicamentos de acordo com o nível de danos provocados ao conceito. A classificação mais popular é a proposta pelo Food and Drugs Administration (FDA) que categoriza os medicamentos em A, B, C, D e X (BRASIL, 2010).

Os danos na reprodução da espécie humana podem ter como fatores causais, a genética e o meio ambiente, além da associação entre estes dois fatores. Podem-se agrupar os danos reprodutivos em diversas classificações como: 1) morte do conceito (aborto), 2) malformações, 3) retardo do crescimento intrauterino e 4) deficiências nas funções orgânicas como o retardo mental (SCHÜLLER-FACCINI; SCHVARTZMAN; CECCHIN, 2001).

Conceitua-se teratogênio como qualquer substância, organismo, agente químico e biológico ou deficiência nutricional, que ao estar presente ao longo da vida do embrião ou do feto, resulta em alterações estruturais ou funcionais na descendência (DICKE, 1989).

Coletivamente, os defeitos congênitos afetam aproximadamente 3% dos nascidos vivos. Encontram-se padrões de ocorrência de danos bastante diferentes para defeitos específicos, de acordo não apenas com o sistema de órgãos acometidos (por exemplo, musculoesquelético), mas também da estrutura afetada (por exemplo, membro), subtipo de defeito de membro (por exemplo, deficiência transversal terminal) e presença de anomalias associadas (por exemplo, deficiência de membro transverso terminal com músculo peitoral ausente) (WERLER; LOUIK; MITCHELL, 2011).

A interação do agente teratogênico sobre o conceito depende de diferentes fatores incluindo o estágio de desenvolvimento do feto, a relação entre a dose e o efeito, o genótipo materno-fetal e os mecanismos celulares e moleculares específicos (SMITHELLS, 1980).

Os mecanismos moleculares de ação mais comuns dos teratógenos são hiperacetilação, desequilíbrio do colesterol, alteração do metabolismo e antagonismo do folato, desequilíbrio do ácido retinóico, desregulação endócrina, desregulação vascular e estresse oxidativo (GIAVINI; MENEGOLA, 2012).

O processo de acetilação das histonas auxilia na descompactação da cromatina, promovendo a expressão gênica. As enzimas histonas desacetilases retiram o radical acetil da cadeia de DNA compactando a cromatina e inibindo a transcrição (GEMMA; VICHI; TESTAI, 2007). Uma nova família de medicamentos surgiu como uma nova classe de agentes anticâncer, conhecidos como: inibidores da histona desacetilase e são capazes de inibir enzimas histona desacetilase induzindo hiperacetilação de histona (MENEGOLA et al., 2005).

Sabe-se que defeitos do tubo neural na população humana se devem à deficiência de ácido fólico durante o início da gestação, o que poderia ser causada pela disponibilidade reduzida do radical metil em células embrionárias e conseqüente hipometilação do DNA (SANCHEZ et al., 2005).

O estresse oxidativo pode estar envolvido na patogênese de vários defeitos congênitos, incluindo malformações esqueléticas, defeitos nos membros, fendas orofaciais e defeitos cardiovasculares. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de defesa antioxidante de uma célula ou tecido. Isso causa a oxidação irreversível do DNA, proteínas e lipídios, levando à inativação de muitas enzimas e morte celular. Os principais fármacos que atuam por este mecanismo são: talidomida, ácido valpróico, fenitoína e suplementos de ferro (ABRAMOV; WELLS, 2011).

O ácido retinóico é o metabólito da vitamina A, conhecido como morfogênico em embriões de vertebrados e invertebrados. Uma relação direta entre a concentração do ácido retinóico, expressão dos genes Hox e a morfogênese craniofacial, vertebral e de membros foi bem documentada. Desequilíbrio entre síntese e a degradação do RA pode resultar em excesso ou deficiência na concentração de RA com efeitos deletérios nas células afetadas (SAWAMURA; SUZUKI; SOMEYA, 2004).

A síntese endógena do colesterol inicia-se a partir do acetato em uma série de etapas enzimáticas. A inibição de algumas enzimas desta série em camundongos resultou em morte de embriões na fase inicial de desenvolvimento, demonstrando o papel fundamental da síntese do colesterol para o desenvolvimento embrionário. O fluconazol, assim como outros fungicidas azólicos usados na terapia humana e na agricultura, demonstram efeito teratogênico em animais de laboratório causando defeitos craniofacial e do esqueleto axial (KEBER et al., 2011).

2.2. Produtos Naturais Teratogênicos

O uso de produtos naturais pode apresentar riscos, especialmente durante a gestação. Uma vez que, há muitos medicamentos que possuem restrições durante o período gestacional, muitas gestantes buscam produtos naturais no auxílio do alívio de sintomas comuns que surgem durante a gravidez (náuseas, vômitos, constipação). Esta prática é disseminada e considerada segura entre as grávidas devido à crença de que “o que é natural não faz mal” (RANGEL; BRAGANÇA, 2009).

Porém, tem-se relatado na literatura, que o uso indiscriminado de plantas medicinais pode resultar em efeitos: teratogênico, embriotóxico e abortivo, devido à capacidade dos ativos vegetais atravessarem a barreira placentária, atingirem o feto e provocarem estes efeitos (BRASIL, 2002).

Aproximadamente 1% das malformações fetais é atribuída à exposição às plantas durante a gestação. Uma hipótese do efeito teratogênico dos vegetais se deve à ação uterotônica potente, que promove uma carência transitória na circulação placenta- fetal, acarretando um conjunto de anomalias congênitas (PASTUSAZK et al., 1997).

As plantas pertencentes à família *Lupinus* provocam deformidades como expressões artrogripóticas de curvatura ou membros contorcidos, curvatura da coluna ou pescoço, e também ocasionalmente fenda palatina com incidência às vezes chegando a 30% (KEELER, 1984).

Na planta da espécie *Veratrum californicum* os metabólitos alcalóides esteróides ciclopamina, jervina e cicloposina são apontados como os principais responsáveis pelos efeitos teratogênicos causadores de malformações congênitas em animais (BLAGOSKLONNY, 2005).

Plantas como a canela (*Cinnamomum verum*), o cravo (*Syzygium aromaticum*), as folhas do café (*Coffea arabica*), o capim-de-oxalá (*Newbouldia laevis*), a quina-verdadeira (*Strychnos pseudoquina*), o quitoco (*Pluchea sagittalis*) e a aroeira (*Schinus terebinthifolius*), usados como chá representam um grupo de plantas abortivas, pois provocam a contração uterina o que gera o aborto espontâneo (CASTRO et al., 2004).

A planta medicinal arruda (*Ruta graveolens*) com ação anti-helmíntica, anti-hemorragica, abortiva, carminativa, antiespasmódica e estimulante. É contraindicada durante a gestação, por aumentar a contratilidade uterina (SOUSA et al., 2004). E no período pós-implantação, Gonzales e colaboradores (2006), comprovaram o efeito embriotóxico e teratogênico do extrato aquoso de folhas de arruda.

A atividade carcinogênica, mutagênica e teratogênica de 11 análogos da hidrazina e íons diazônio derivados de 22 espécies de cogumelos foram descritos (TOTH, 1991). As proteínas inativadoras de ribossomo estão associadas à malformação fetal. Em um estudo com o cogumelo da espécie *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) com alto conteúdo destas proteínas foram

observadas anormalidades embrionárias em camundongos localizadas no tubo neural craniano, botões dos membros anteriores, branquial arcos e eixo do corpo); em altas concentrações, bolhas no prosencéfalo e no interior do mesênquima cranial (CHAN et al., 2010).

Embora muitos produtos naturais sejam contraindicados durante a gestação, devido aos riscos de efeitos embriotóxico, teratogênico e abortivo, muitos fatores contribuem para o consumo comum entre as gestantes incluindo: por serem economicamente mais acessíveis, por falta de conhecimento dos danos provocados destes produtos durante a gestação e por serem considerados menos nocivos ao organismo da mãe e do feto (RODRIGUES et al., 2011).

2.3. Cogumelos Comestíveis

Os cogumelos comestíveis são considerados alimentos de elevada qualidade nutricional. Classificados como alimentos funcionais ou nutracêuticos são utilizados em forma de chás ou cápsulas como preventivos de algumas doenças (FURLANI; GODOY, 2005). Aproximadamente 2000 espécies de cogumelos comestíveis são conhecidas, entretanto apenas 25 dessas são comumente utilizadas na alimentação humana (COUTINHO, 2009). Os extratos de cogumelo podem apresentar como principais componentes antioxidantes compostos fenólicos (ELMASTAS et al., 2007).

O cogumelo *Agaricus blazei* tem alta concentração de tocoferóis, que segundo Tsai, Tsai e Mau (2007), são os compostos responsáveis pela sua atividade antioxidante. O *A. blazei* contém a enzima antioxidante polifenol oxidase (HASHIMOTO et al., 2006). Cobre, zinco e selênio são metais presentes no cogumelo *A. blazei* e podem ser benéficos para a proteção contra a geração de radicais, porque os minerais têm atividades de eliminação de radicais, além de estarem contidos na estrutura de enzimas antioxidantes.

O cogumelo *Ganoderma lucidum* apresenta grande potencial terapêutico podendo ser utilizado na prevenção e tratamento de doenças como o câncer, hepatite, hipertensão, diabetes, úlcera gástrica e AIDS (PATERSON, 2006). Os fenóis totais foram um dos componentes antioxidantes encontrados naturalmente nos extratos de *G. lucidum* (MAU; LIN; CHEN, 2002). No entanto,

pesquisas mostraram que o peptídeo *G. lucidum* (GLP) é o principal antioxidante componente de *G. lucidum*. O GLP pode desempenhar um papel importante na inibição da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, quelação de metais e de eliminação de radicais livres (SUN; HE; XIE, 2004).

2.3.1. Cogumelo *Agaricus blazei*

O cogumelo *A. blazei*, também conhecido popularmente como cogumelo do sol, é nativo do Brasil. De acordo com sua classificação taxonômica consiste em um fungo verdadeiro, pertencente ao reino Fungi, divisão Basidiomycota, ordem Agaricales, família Agaricaceae (URBEN et al., 2001).

A. blazei é rico em polissacarídeos como oligossacarídeos e proteínas, especialmente β -glucanas. As β -glucanas e os oligossacarídeos hidrolisados demonstraram atividades anti-hiperglicêmicas, anti-hipertrigliceridêmicas, anti-hipercolesterolêmicas e antiarterioscleróticas, indicando atividade antidiabética como um todo em ratos diabéticos. As β -glucanas, fibras solúveis, tem demonstrado significativa importância na redução do colesterol sanguíneo e na absorção de glicose pelos diabéticos (KIM et al., 2005).

As β -glucanas presentes no *A. blazei* podem reparar as lesões em células β -pancreáticas induzidas pela exposição à estreptozotocina (STZ) (MA et al., 2015; YANG et al., 2010; NIWA; TAJIRI; HIGASHINO, 2011; RAHAR et al., 2011; KIM et al., 2005).

O interesse dos pesquisadores no cogumelo está relacionado às suas propriedades medicinais como: capacidade imunoestimuladora agindo como ativadores das células β do sistema imune e fortalecendo o mesmo; além de sua potencialidade anticarcinogênica (SORIMACH et al., 2001; KIMURA et al., 2004; BERNARDSHAW et al., 2006; KAWAMURA; KASAI, 2006). Outros mecanismos de ação imunológicos do *A. blazei* descritos são: a regulação da proliferação e ativação de linfócitos T, a produção de óxido nítrico (NO) e a secreção de citocinas (KUO, 2002).

No estudo de Niwa et al. (2011), a administração de extratos de *A. blazei* a ratos diabéticos reduziu significativamente o aumento da glicemia em jejum e os índices de hemoglobina glicada (HbA1c), além de aumentar a perda de massa corpórea, um fator de risco associada a de desenvolver diabetes. Os

resultados sugerem que os efeitos antidiabéticos resultam da supressão do estresse oxidativo e da citocina pró-inflamatória, TNF- α e melhora na massa de células β . Ademais a *A. blazei* reduziu significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio nas células vasculares e nas células sanguíneas periféricas

No estudo clínico com uso de *A. blazei* em humanos, observou-se a redução da porcentagem de gordura corporal e de gordura visceral com aumento da atividade natural das células natural *killer* (NK), enquanto que os níveis de colesterol e glicose no sangue diminuíram (LIU et al., 2008).

A suplementação de extrato de *A. blazei* melhorou a resistência a insulina entre indivíduos com DM tipo 2 (HSU et al., 2007). Os oligossacarídeos presentes no cogumelo apresentaram cerca de duas vezes a atividade dos β -glucanos em relação à atividade como antidiabéticos (KIM et al., 2005).

2.3.2. Cogumelo *Ganoderma lucidum*

O *G. lucidum*, também conhecido como cogumelo rei, cogumelo do imperador ou cogumelo brilhante, pertencente à classe dos basidiomicetos, família Polyporaceae possui diversos efeitos biológicos e tem sido utilizado na China há mais de 2000 anos, como alimento funcional e medicinal. Também é consumido nos Estados Unidos como suplemento alimentar, seja em forma de cápsulas ou chás e foi trazido para o Brasil na forma de sementes através da EMPRAPA (URBEN, 2004).

No Brasil, algumas pessoas produzem esse fungo usando o método Jun-Cao e, é classificado como produto nutracêutico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1999).

O *G. lucidum* apresenta uma variedade de atividades biológicas, tais como: imunoestimulante, antimicrobiano, anti-inflamatório, anti-hiperglicêmico, proteção hepática e renal, efeitos antioxidantes e antivirais (ZHU et al., 2013).

As aplicações farmacológicas e clínicas dos extratos aquoso/etanol de *G. lucidum* incluem a prevenção ou tratamento de vários tipos de doenças humanas, tais como alergia, bronquite, hiperglicemia, inflamação, nefrite, hepatopatia, artrite, hipertensão, neurastenia e doenças crônicas tais como hepatite. Também é usado para reduzir a probabilidade de tumores invasão e

metástase e prevenir a ocorrência ou recorrência de vários tipos de cânceres. O potencial nutricional e os valores medicinais de *G. lucidum* atraíram uma grande quantidade de atenção na busca por seus componentes bioativos e mecanismo subjacente (TEOW, 1997; WANG; LI, 2002; SONG et al., 2004).

Algumas investigações científicas confirmaram repetidamente os efeitos benéficos de *G. lucidum* para a saúde e agora são frequentemente promovidos como um agente efetivo contra cânceres devido às suas propriedades imunomoduladoras intrínsecas e antitumorais (WANG; LI, 2002).

G. lucidum contém várias moléculas bioativas, como triterpenóides, polissacarídeos, nucleotídeos, ácidos graxos, glicoproteínas, esteróis, esteróides, proteínas, proteoglicanas e peptídeos (BATRA; SHARMA; KHAJURIA, 2013). Entre estes, triterpenóides, polissacarídeos, proteoglicanas e proteínas têm efeitos hipoglicêmicos (TENG et al., 2012).

Os triterpenóides presentes no *G. lucidum* são inibidores da aldose redutase e α -glucosidase (FATMAWATI; KONDO; SHIMIZU, 2013). Destes, a aldose redutase é a primeira enzima na via do polioliol, que processa glicose em sorbitol. O acúmulo de sorbitol pode levar às complicações diabéticas como: neuropatia, nefropatia, catarata e retinopatia (SCHEMMEL; PADIYARA; D'SOUZA, 2010).

Fatmawati e colaboradores (2009) descobriram que os extratos metanólicos de *G. lucidum* contem a aldose com maior atividade inibitória da redutase entre 17 cogumelos comestíveis e medicinais.

Os polissacarídeos inibem a hiperglicemia regulando a expressão de várias enzimas-chave na via do metabolismo da glicose, como glucoquinase hepática, fosfofrutoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicogênio fosforilase hepática, frutose-1,6-bisfosfatase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase, respectivamente. Seu mecanismo de ação baseia-se na liberação de insulina devido a uma facilitação do influxo de cálcio para as células β - pancreáticas (ZHANG; LIN, 2004).

Jia e colaboradores (2009) demonstraram que o *G. lucidum* administrado por via oral possuía ação significativa anti-hiperglicêmica e antioxidante, normalizando o estresse oxidativo, o plasma e o fígado dos ratos diabéticos.

G. lucidum também impediu a ativação induzida por aloxana de processos de peroxidação lipídica no pâncreas e demonstrou propriedades

insulinogênicas definidas (ZHANG et al., 2003), enquanto um estudo duplo-cego controlado por placebo mostrou que 200 mg de *G. lucidum* por dia poderia melhorar os níveis de açúcar no sangue em pacientes diabéticos não dependentes de insulina (ZHAO; LI; HU, 2006).

O proteoglicano de *G. lucidum* pode inibir a proteína tirosina fosfatase PTP1B *in vitro*, um alvo terapêutico para tratamento de diabetes e que desempenha importante papel na regulação negativa da sinalização do receptor de insulina e diminuição da expressão da subunidade do receptor de insulina. Apresenta efeito hipoglicêmico, pois inibe a atividade do PTP1B e diminui a expressão da proteína PTP1B nas células musculares esqueléticas e aumenta os níveis de insulina no sangue (TENG et al., 2012).

As extrações de *G. lucidum* foram divididas em sete frações no estudo de Oka e colaboradores (1990) e a expressão hepática do transportador de glicose 2 (GLUT2) foi inibida pela quinta fração de *G. lucidum*, denominada Fudan-Yueyang-*G. lucidum* (FYGL) e correlacionado com a produção hepática de glicose. Essas propriedades do FYGL apresentaram-se como dose-dependentes e aumentaram o uso de glicose em células musculares e adipócitos e menor produção de glicose hepática no sangue para diminuir os níveis de glicose no sangue.

A proteína Ling Zhi-8 (LZ-8) extraída de *G. lucidum* apresenta atividades imunomoduladoras e anti-diabetes tipo I (KINO; YAMASHITA; YAMAOKA, 1989; KINO et al., 1991). LZ-8 tem atividade mitogênica e pode diminuir a concentração de glicose no plasma. O LZ-8 diminuiu significativamente infiltração linfocitária e aumento da detecção de anticorpos pela insulina em células beta. Pode estimular também a geração de células T supressoras para inibir os mitógenos produzidos por linfócitos do sangue periférico humano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil reprodutivo feminino e gestacional de ratas Wistar saudáveis e prenhas expostas diariamente aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* (100 mg/kg/dia) e os efeitos materno e embriofetal nos períodos: 1º ao 8º dia gestacional (pré-implantação e implantação) e 9º ao 19º dia gestacional (pós-implantação).

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar os efeitos sobre os parâmetros gestacionais (implantação e perdas embriofetais), em fêmeas expostas aos cogumelos e identificar o estágio gestacional sensível à ação dos cogumelos.
2. Determinar as possíveis alterações estruturais e ósseas em fetos de ratas Wistar tratadas com cogumelos.
3. Determinar as possíveis alterações morfológicas na placenta e rins, de ratas Wistar tratadas com cogumelos.
4. Determinar as possíveis alterações no perfil hematológico e bioquímico de ratas Wistar tratadas com cogumelo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um ensaio pré-clínico, experimental com animais.

4.2. Aspectos legais

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba Ceua/Uniso, Sorocaba-SP, e aprovado sob o Protocolo 089/2016 (anexo). O projeto foi aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp/Processo no. 2015/24566-9), sob a coordenação da Profa. Dra. Marli Gerenutti. A Profa. Dra. Yoko Oshima Franco assumiu institucionalmente a orientação a partir da decisão colegiada de 21/02/2019, em sua 126ª Reunião.

4.3. Pó liofilizado

Os cogumelos foram adquiridos comercialmente da Yuri Cogumelos (Sorocaba, SP, Brasil). As amostras de cogumelo *in natura* foram picadas em tamanhos homogêneos, no mesmo dia da coleta; foram armazenadas em *biofreezer* a -80 °C (REVCO® ULT-1386-3-D) por um período de aproximadamente 24 h; o material congelado foi liofilizado em Liofilizador - Termo Savant, LK-40, até a obtenção de 10% de massa seca. A amostra seca foi moída (moinho de facas e martelo marca Marconi®), em seguida tamisada em tamises (malha 50 e malha 60), com a finalidade de obtenção de partículas homogêneas para serem suspensas em água. O pó tamisado foi acondicionado em embalagens plásticas herméticas mantidas em dessecador.

4.4. Animais

4.4.1. Acasalamento, prenhez, exposição aos cogumelos e procedimento de cesárea

Os estudos *in vivo* compreenderam os ensaios sobre a reprodução. Ratos Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 180 a 200 g foram adquiridos com os respectivos atestados de saúde do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Os animais foram ambientados no Biotério de Experimentação Animal do Lapetox, em temperatura e ciclos claro/escuro, controlados automaticamente, a 25 ± 3 °C e 12 horas, respectivamente. Os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Para o acasalamento, os animais foram alojados em número de três, 01 macho com 02 fêmeas, por um período noturno de 12 horas. Por meio de observações microscópicas (Microscópio Biológico, Modelo Axio Lab. A1, ZEISS®), a indicativa do primeiro dia da prenhez foi a presença ou não de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal (GERENUTTI; DEL FIOL; GROppo, 2006).

O estudo foi dividido em duas etapas: (I) Capacidade reprodutiva materna, em dois períodos: perdas pré-implantação e pós-implantação; (II) Efeitos sobre a prole. Todas as ratas prenhes foram alojadas em número de um animal por gaiola e divididas em 5 grupos de seis animais, conforme descrito e ilustrado (Figura 1), a seguir:

- Grupo CS (n=6): controle negativo - recebeu solução salina;
- Grupo Ab_A (n=6): 1º ao 8º dia – *A. blazei* (100 mg/kg/dia);
- Grupo Ab_D (n=6): 9º ao 19º dia – *A. blazei* (100 mg/kg/dia);
- Grupo Gl_A (n=6): 1º ao 8º dia – *G. lucidum* (100 mg/kg/dia);
- Grupo Gl_D (n=6): 9º ao 19º dia – *G. lucidum* (100 mg/kg/dia).

para contagem dos sítios iniciais de implantação e de reabsorções (SALEWSKY, 2006). Os embriões ou fetos degenerados ou mortos e os fetos vivos também foram contados.

A partir das contagens realizadas foram calculados os seguintes índices gestacionais apresentados como média \pm desvio padrão:

- a) Índice de implantação = n° de sítios de implantação/ n° de corpos lúteos x 100;
- b) Índice de mortalidade = n° de fetos degenerados ou mortos/ n° de sítios de implantação x 100;
- c) Índice de reabsorção = n° de reabsorções/ n° de corpos lúteos x 100;
- d) Índice de perda embrionária antes da implantação = n° de corpos lúteos - n° de sítios de implantação/ n° de corpos lúteos x 100
- e) Índice de perda embrionária total = somatória dos itens d + c + b
- f) Índice de viabilidade embrionária = 100 – item e

As placentas, fetos e ovários foram pesados (Ohaus®, AS200S) permitindo a avaliação da interferência dos cogumelos sobre o desenvolvimento destas estruturas. Utilizando-se microscópio estéreo contou-se o número de corpos lúteos nos ovários para os cálculos de índices reprodutivos e analisaram-se os fetos para a identificação de malformações externas e ósseas.

4.5. Avaliação bioquímica materna

Para a avaliação bioquímica – da função hepática (dosagens de alanina aminotransferase, ALT e aspartato aminotransferase, AST); da função renal (creatinina e uréia); dos níveis de glicose; insulina; lipase; triglicérides; colesterol e HDL – utilizou-se o equipamento automático Cobas C111. Todos os kits comerciais utilizados nas análises foram produzidos pelo laboratório da indústria Roche® (São Paulo-SP, Brasil).

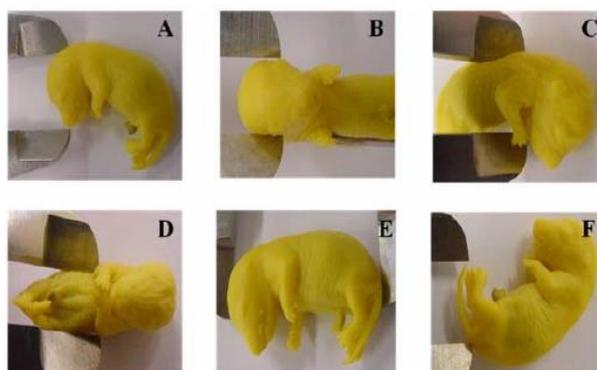
4.6. Avaliação hematológica materna

Os parâmetros hematológicos, hemoglobina, hematócrito, glóbulos brancos (WBC), contagem total de eritrócitos (RBC) número de plaquetas (PLT) foram analisados com o auxílio do equipamento automático Hematologia XS 1000i WAS, Roche®.

4.7. Avaliação morfológica fetal

Os fetos, anestesiados e eutanasiados após anestesia inalatória induzida com halotano (saturação de cuba), foram divididos em três grupos: (1) análises morfológicas e morfométricas externas (fixados em líquido de Bodian) – conforme Figura 2: (A) antero–posterior do crânio, (B) látero–lateral do crânio, (C) antero–posterior do tórax, (D) látero–lateral do tórax, (E) crânio–caudal, (F) cauda; (2) para análise histológica da placenta (processados, os órgãos foram fixados, seccionados e corados com Hematoxilina e Eosina; (3) análise óssea (procedimentos de evisceração, diafanização e coloração com Alizarin red S plus Alcian blue – contagem de ossos e avaliação de agenesia ósseas de crânio, costelas, vértebras e membros) (ESTEVES-PEDRO et al., 2012; RANDAZZO-MOURA et al., 2011).

Figura 2- Medidas dos aspectos anatômicos externos dos fetos.



Legenda: Medidas em cm: (A) antero–posterior do crânio, (B) látero–lateral do crânio, (C) antero–posterior do tórax, (D) látero–lateral do tórax, (E) crânio–caudal, (F) cauda.

Fonte: RANDAZZO-MOURA et al. (2011).

4.8. Análise estatística

Para a análise dos resultados utilizou-se o nível de significância entre 1 e 5%. Foi utilizada a análise de variância Anova para dados paramétricos, seguida do teste Tukey-Kramer para comparações múltiplas em todos os experimentos realizados, através do programa Prisma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ganho de peso materno e desempenho reprodutivo

O ganho ou a perda de peso corporal bem como o ganho ou perda de massa relativa de órgãos são utilizados para avaliar o efeito de certas substâncias em diferentes áreas da toxicologia, como na toxicologia médica, ambiental e alimentar (BHASKAR; MOHANTY, 2014; LU et al., 2014; LEMOS et al., 2015; MUKERJI et al., 2015; DAS et al., 2015; OLSON et al., 2015). Este parâmetro de toxicidade é empregado para avaliar as diferentes exposições – aguda, subaguda e crônica. Lemos e colaboradores (2015) o utilizaram para determinar doses potencialmente letais de efluentes de curtume, por meio da indução de toxicidade aguda em camundongos da linhagem BALB/c. Da mesma forma, Silva e colaboradores (2016) o utilizaram para avaliar o efeito toxicológico agudo do extrato bruto metanólico do *Parahancornia amapa* em modelo animal.

A tabela 1 apresenta os dados de variação de peso e desempenho reprodutivo de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós implantacional.

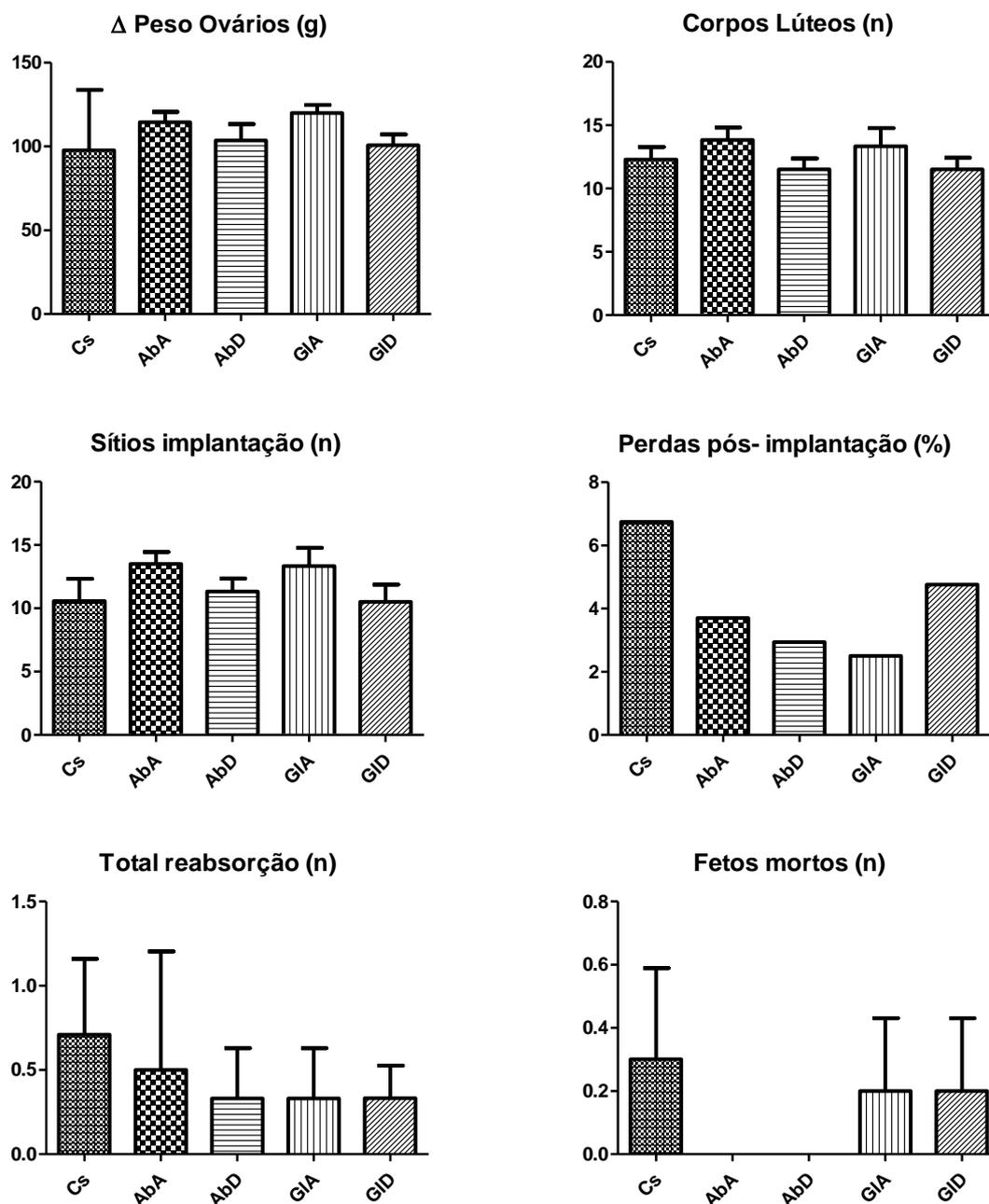
Tabela 1- Ganho de peso materno e desempenho reprodutivo.

	C	Ab _A	Ab _D	Gl _A	Gl _B
Δ Peso corporal					
(1 ^o - 20 ^o dg)	97,7 ± 62,5	114,5 ± 0,6	103,5 ± 17,2	120,0 ± 8,3	100,8 ± 10,9
Corpos Lúteos (n)	12,2 ± 1,7	13,8 ± 1,7	11,5 ± 1,5	13,3 ± 2,5	11,5 ± 1,6
Sítios implantação (n)	10,5 ± 3,0	13,5 ± 1,6	11,3 ± 1,7	13,3 ± 2,5	10,5 ± 2,3
Perdas pós- implantação (%)	6,7	3,7	2,9	2,5	4,7
Total reabsorção (n)	0,7 ± 0,7	0,5 ± 1,2	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,5
Fetos mortos (n)	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4
Fetos vivos (n)	9,5 ± 2,3	13,0 ± 1,5*	11,0 ± 1,7	12,8 ± 2,6	9,8 ± 1,7

Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1^o- 8^o), Ab_D (*A. blazei* 9^o-19^o), Gl_A (*G. lucidum* 1^o- 8^o), Gl_B (*G. lucidum* 9^o-19^o). *p<0.05 em comparação ao grupo Controle (Cs) (Anova, seguida de Tukey-Kramer). n, quantidade. dg, (dias gestacionais)

A Figura 3 ilustra o desempenho reprodutivo e gestacional dos parâmetros apontados na tabela 1.

Figura 3- Desempenho reprodutivo e gestacional frente à exposição materna aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum*.



Legenda. Δ, variação. n, quantidade.

O intervalo da variação de peso do grupo Cs foi de 35,21–160,29 g durante todo o período. Isto mostra que a variação de peso dos grupos A.

blazei Ab_A e Ab_D e *G. lucidum* Gl_A e Gl_D encontra-se nos limites considerados normais.

A exposição do organismo materno a ambos os cogumelos, nos períodos gestacionais considerados, mostra que não houve interferência no desempenho gestacional. De modo geral, as perdas embrionárias foram em média 2 ou 3 vezes menores nos grupos tratados quando comparados ao controle. Pode-se observar uma tendência ($p > 0,05$) diminuída na quantidade de reabsorções e fetos mortos nos grupos tratados quando comparada ao grupo controle. A administração de *A. blazei* e *G. lucidum* em ambos os períodos gestacionais comparativamente ao grupo controle mostra uma tendência, portanto, mais protetiva que deletéria.

5.2. Toxicologia Fetal

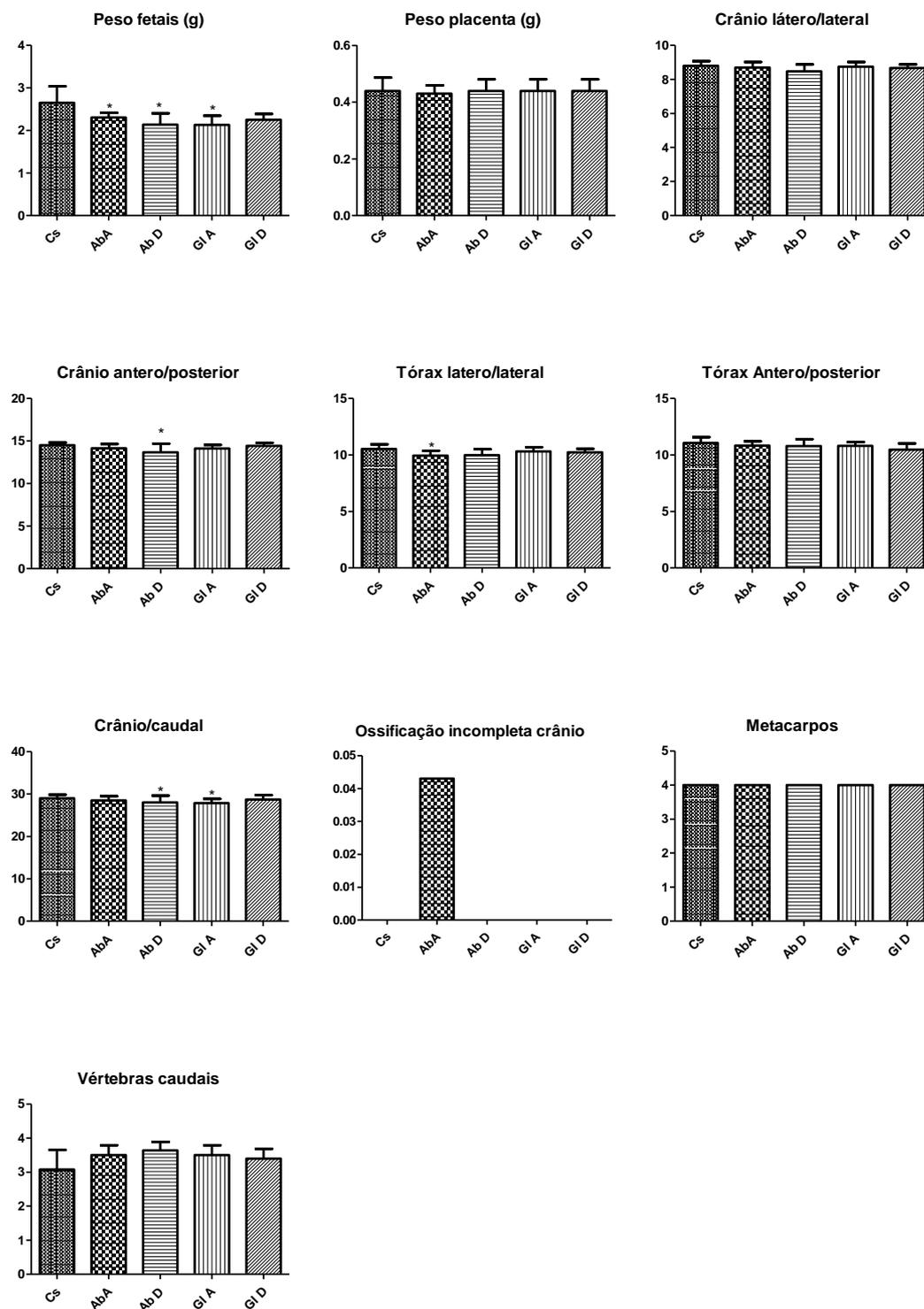
A tabela 2 e a Figura 4 apresentam os dados do peso fetal (em g) ao nascimento, placenta (em g), morfometria fetal (em cm), e centros de ossificação (n) no 20º dia gestacional.

Tabela 2- Avaliação das alterações estruturais em fetos de ratas Wistar tratadas com cogumelos - peso fetal ao nascimento (g), placenta (g), morfometria fetal (cm) e centros de ossificação (n) no 20º dia de gestação).

	Cs	Ab _A	Ab _D	Gl _A	Gl _D
Peso fetos	2,6±0,6	2,3±0,1*	2,1±0,4*	2,2±0,2*	2,2±0,2
Peso placenta	0,4±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0
Crânio látero/lateral	8,8±0,4	8,7±0,5	8,4±0,6	8,7±0,4	8,6±0,3
Crânio antero/posterior	14,5±0,5	14,1±0,8	13,6±1,7*	14,1±0,7	14,4±0,6
Tórax latero/lateral	10,5±0,7	9,9±0,7*	9,9±0,9	10,3±0,6	10,2±0,5
Tórax Antero/posterior	11,0±0,8	10,8±0,6	10,7±1,0	10,8±0,5	10,7±0,6
Crânio/caudal	29,0±1,4	28,4±1,7	28,0±2,8*	27,8±1,7*	28,7±1,8
Malformações externas	0	0	0	0	0
Malformações esqueléticas	0	0	0	0	0
Ossificação incompleta crânio	0 / 10	1/23	0/26	0/20	0/26
Anomalias de vértebras	0	0	0	0	0
Anomalias de costelas	0	0	0	0	0
Metacarpos	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
Vértebras caudais	3,3±0,6	3,5±0,5	3,4±0,4	3,5±0,5	3,4±0,5

Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1º- 8º), Ab_D (*A. blazei* 9º-19º), Gl_A (*G. lucidum* 1º- 8º), Gl_D (*G. lucidum* 9º-19º). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle (Cs), utilizando-se Anova, seguida de Tukey-Kramer. n, quantidade.

Figura 4- Toxicologia fetal sob os parâmetros peso fetal ao nascimento, placenta, morfometria fetal e centros de ossificação no 20º dia de gestação.



Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°). *p<0,05 em comparação ao grupo Controle (Cs), utilizando-se Anova, seguida de Tukey-Kramer.

Observa-se a ausência de significância no peso dos ovários e placenta, e a diminuição significativa do peso fetal, independente do período gestacional, indicando que os cogumelos poderiam evitar o nascimento de uma prole com peso acima do desejável.

Ao se analisar a relação feto/placenta, observa-se uma diminuição de em média 6,0 para 5,0 nos grupos *A. blazei* e *G. lucidum*, mostrando que na presença de ambos os cogumelos, o crescimento fetal parece ter sido mais vulnerável do que o crescimento placentário.

Observa-se que o grupo tratado com *A. blazei* no período organogênético (9-19) apresentou crescimento crânio-caudal, caudal e crânio (antero-posterior) significativamente diminuídos quando comparado ao grupo controle. Similarmente, os animais pertencentes ao grupo *G. lucidum* (1-8) apresentaram um menor crescimento quando comparados ao grupo controle.

No trabalho de Viroel (2018), os fetos das ratas expostas ao *G. lucidum* mostraram maiores medidas fetais de cabeça, tórax, craniocaudal e cauda. As ratas Wistar prenhas foram expostas ao pó liofilizado reconstituído de *G. lucidum* antes e após a indução do Diabetes Gestacional (dose única de 40 mg/kg, IV) no oitavo dia de gestação, possui feitos protetores sobre os fetos. Pode-se inferir que a maior exposição ao *G. lucidum* pode causar efeitos genotóxicos, portanto o tempo de exposição deve ser considerado.

O período de gestação diferiu em relação aos efeitos genotóxicos causados pelos cogumelos em estudo, podendo-se inferir que os mecanismos de toxicidade devem ser diferentes.

Estudos realizados por Schafer e colaboradores (2006) demonstraram índices de baixo peso, embora não tenham sugerido uma explicação metabólica plausível. Contudo, sabe-se que a restrição do crescimento placentário é um fator determinante para a restrição do crescimento fetal (peso e comprimento) visto que isso possibilita a diminuição de acessos a nutrientes e oxigênio pela barreira materno – fetal. Por outro lado, não foi identificado neste estudo, restrição no crescimento placentário, restando assim, a necessidade de estudos acerca da organização histológica placentária, a qual pode estar interferindo no desenvolvimento fetal.

Avaliou-se neste estudo como parâmetro a teratogenicidade que é definida como a capacidade de uma substância (teratógeno) causar malformações em organismos em desenvolvimento (DUONG et al., 2011).

Os resultados de malformações externas, ósseas, craniana, de costelas, metacarpos e vértebras caudais não apresentaram relevância estatística, e com base nos dados obtidos, não se observou efeito teratogênico induzido pelo uso de *A. blazei* e *G. lucidum*. Estes resultados corroboram com o estudo de Andersson e Gry (2004) em ratas grávidas que receberam um extrato aquoso de *A. bisporus* por 15 dias. Após o tratamento foram examinados parâmetros quanto à embriotoxicidade (perda pré-implantação, número de reabsorções de fetos), teratogenicidade (malformações externas e esqueléticas) e não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, nem qualquer influência sobre o peso corporal das mães e dos fetos pode ser detectada.

Sabe-se que proteínas inativadoras de ribossomos (PIR) de plantas podem prejudicar o desenvolvimento embrionário em camundongos. Recentemente, um efeito semelhante demonstrou para dois PIRs de cogumelo, liofilina de *Lyophyllum shimeji*, que também provoca anormalidades embrionárias em camundongos (CHAN et al., 2010); e hypsina de *Hypsizigus marmoreus*. Por outro lado, outro PIR, velutina de *Flammulina velutipes* não exerceu influência adversa no desenvolvimento do camundongo, indicando que a teratogenicidade não é uma característica geral de todos os PIRs (NG et al., 2010).

5.3. Perfil hematológico e bioquímico materno

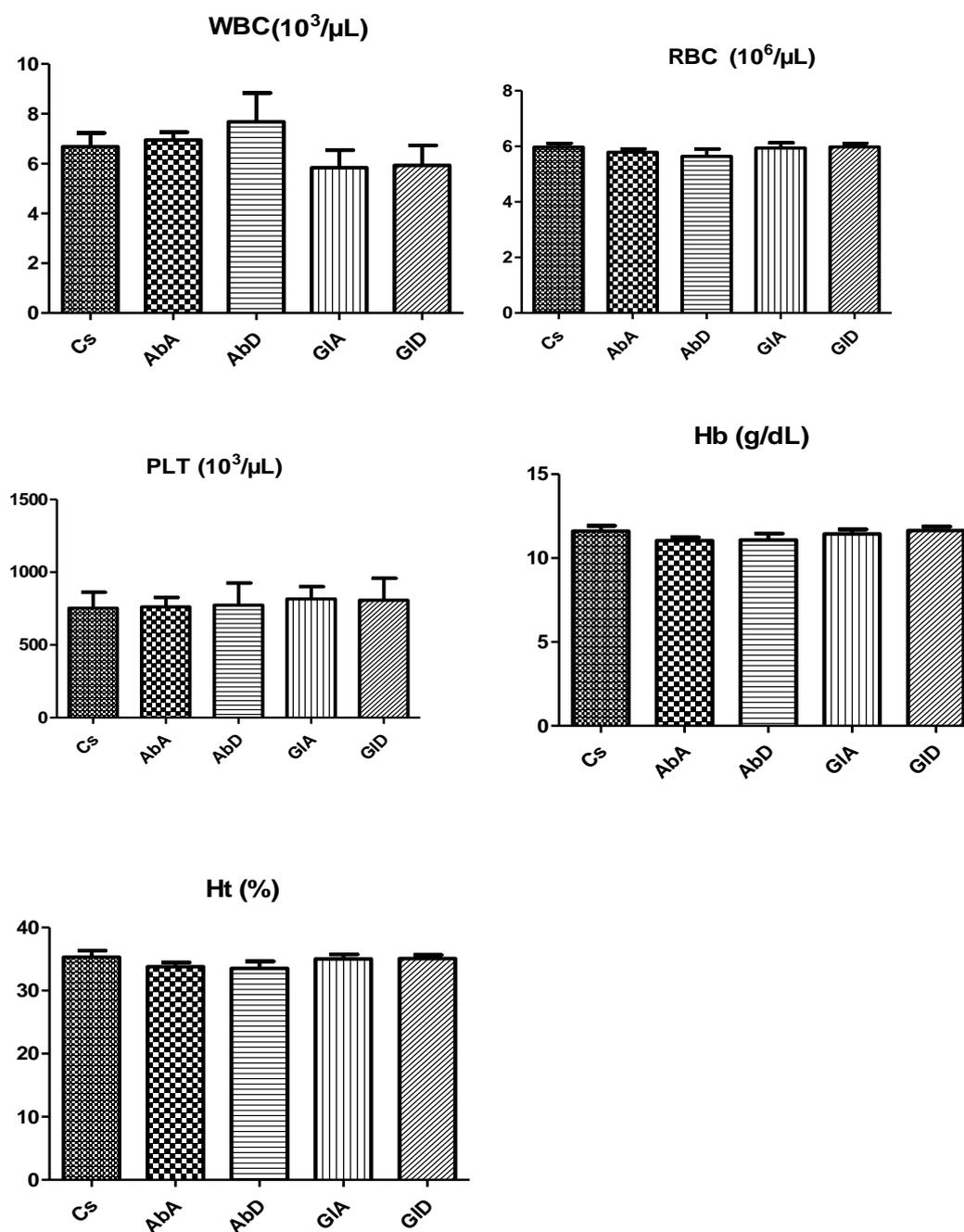
O parâmetro hematológico é um indicador biológico de efeito extremamente utilizado em todas as áreas (medicina humana, medicina veterinária, odontológica e em pesquisa básica ou pré-clínica). Após a absorção, o sistema circulatório e os elementos constituintes do sangue são os primeiros a sofrerem os impactos dos agentes tóxicos. A tabela 3 e a Figura 5 apresentam os dados do perfil hematológico e bioquímico de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós implantacional.

Tabela 3- Perfil hematológico de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós-implantacional.

	Cs	Ab_A	Ab_D	Gl_A	Gl_D
WBC (10 ³ /μL)	6,3± 0,9	6,9± 0,5	7,6± 2,0	5,8± 1,2	5,9± 1,3
RBC (10 ⁶ /μL)	5,9± 0,2	5,7± 0,2	5,6± 0,4	5,9± 0,3	5,9± 0,2
PLT (10 ³ /μL)	751,8± 191,1	760,8± 114,4	772,5± 263,2	815,0±145,6	807,0± 259,7
Hb (g/dL)	11,6± 0,5	11,0± 0,3	11,0± 0,8	11,4± 0,4	11,6± 0,4
Ht (%)	35,2± 1,8	33,8± 1,2	33,5± 1,9	35,0± 1,1	35,0± 0,9

Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°-8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°).

Figura 5- Perfil hematológico de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré- e pós-implantacional.



Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°). Note a ausência de parâmetros significativos entre os grupos ($p > 0,05$).

A análise estatística dos dados de perfil hematológico materno não demonstrou nenhuma significância nos parâmetros WBC, RBC, Hb, Ht e PLT dos grupos Ab₁₋₈ (*A. blazei*), Ab₉₋₁₉ (*A. blazei*), Gl₁₋₈ (*G. lucidum*), Gl₉₋₁₉ (*G. lucidum*) comparativamente ao grupo controle CS.

As constituições químicas desses cogumelos são conhecidas, o *A. blazei* contém 29,23% de ácido palmítico, 7,46% de ácido esteárico, 10,84% de ácido oleico, 49,68% de ácido linoleico e 2,34% de ácido aracdônico (ORSINE; BRITO; NOVAES, 2012) e, o *G. lucidum* apresenta aminoácidos, açúcares totais, compostos fenólicos, proteínas, fibras, gorduras, calorias, minerais, cálcio, ferro e sódio na sua composição (SIMIONI; JOSEFINO; RODRIGUES, 2008). Então, depreende-se que tais elementos presentes nas doses de 100 mg/kg/dia dos cogumelos administrados via gavagem, não induzem hemotoxicidade materna, corroborando dados da literatura de ausência de efeitos adversos.

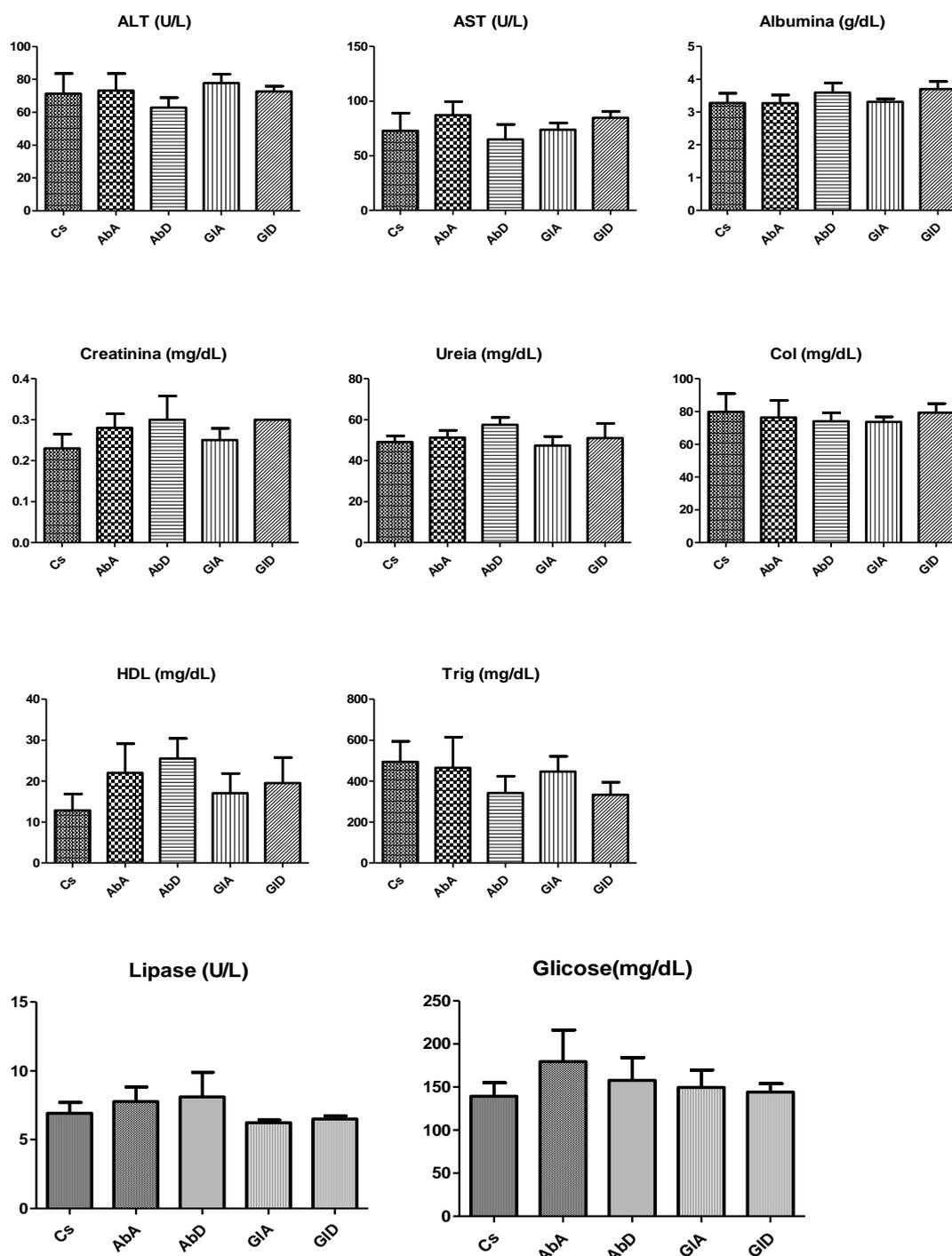
Outro indicador biológico de possível efeito tóxico é obtido através de dosagens bioquímicas. O perfil bioquímico materno está apresentado mais detalhadamente na tabela 4 e na Figura 6.

Tabela 4- Perfil bioquímico de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós-implantacional.

	Cs	Ab _A	Ab _D	Gl _A	Gl _D
ALT (U/L)	71,3± 21,2	73,2± 17,9	62,8± 10,6	77,7± 9,1	72,6± 5,7
AST(U/L)	72,8± 28,0	87,2± 21,2	64,9± 24,2	73,7± 10,7	84,8± 9,7
Albumina (g/dL)	3,2± 0,5	3,2± 0,4	3,6±0,5	3,3± 0,1	3,7± 0,4
Creatinina(mg/dL)	0,2± 0,0	0,2± 0,0	0,3± 0,1	0,2± 0,0	0,3± 0,0
Uréia (mg/dL)	49,0± 5,1	51,2± 6,1	57,6± 6,1	47,4± 7,6	51,0± 12,4
Col (mg/dL)	79,8± 19,2	76,4± 17,8	74,0± 9,0	73,7± 5,3	79,4± 9,5
HDL (mg/dL)	12,8± 7,0	22,0± 12,3	25,5± 8,5	17,0± 8,2	19,5± 10,9
Trig (mg/dL)	494,6± 174,2	465,8± 258,9	342,1± 142,7	447,0± 128,1	334,0± 106,9
Insulina (ng/mL)	1,6± 0,5	1,8± 0,5	1,5± 0,3	2,0± 0,5	2,2± 0,8
Lipase (U/L)	6,9± 1,3	7,7± 1,8	8,1± 3,1	6,2± 0,3	6,5± 0,4
Glicose (mg/dL)	139,2± 27,0	179,4± 63,6	157,8± 45,6	149,3± 35,0	144,2± 16,6

Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°).

Figura 6- Perfil bioquímico frente à exposição materna aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante a prenhes.



Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°).

O range da variação de ALT do grupo Cs foi de 49,96 – 92,64 U/L e o de AST foi de 44,79 – 100,91 U/L. Todos os valores obtidos dos grupos Ab_A (*A.*

blazei), Ab_D (*A. blazei*), Gl_A (*G. lucidum*), Gl_B (*G. lucidum*) estão nos limites do range do grupo Cs, também corroborado pela ausência de significância estatística entre os grupos. Esses resultados evidenciam a ausência de hepatotoxicidade induzida pelos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum*.

O período gestacional é marcado por intensa alteração hormonal que pode ter efeitos sobre os parâmetros hematológico e bioquímico (CHRISTIAN, 2001), promovendo uma hemodiluição sanguínea e reduzindo os níveis de ureia e creatinina, os quais não foram observados neste trabalho, o que pode sugerir um possível efeito protetor dos cogumelos.

Na tabela 4, estão apresentadas as dosagens bioquímicas de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides realizadas em soros de ratas. Sabe-se que o aumento do nível do colesterol total e triglicérides, são fatores importantes na determinação de predisposição a doenças cardiovasculares (WU et al., 2003; LONDERO; RIBEIRO; CARGNELUTTI FILHO, 2008). Nota-se que não houve aumento significativo de colesterol total e triglicérides e sim uma diminuição mesmo que não apresentando significância, o que pode nos direcionar a um possível efeito protetor contra doenças cardiovasculares.

Com base nos dados anteriores destaca-se que o perfil bioquímico não foi modificado significativamente pela administração dos cogumelos. Contudo, aumentos pontuais nos níveis de colesterol HDL e diminuição dos níveis de colesterol total e triglicérides foram registrados, corroborando aos estudos realizados por Kabir, Kimura e Tamura (1988) e Mizuno (2004). Além disso, os hipolipidêmicos atuam como agentes protetores do infarto do miocárdio e doenças coronarianas (ASSMANN; NOFER, 2003), uma grande promessa a qualquer candidato a este efeito, como os cogumelos comestíveis.

Ademais, não houve diferença significativa dos níveis de insulina e glicose, quando comparados ao controle, mas apenas uma tendência de aumento, que segundo Harkness e Wagner (1993) o aumento destes componentes estaria relacionado a flutuações fisiológicas. Por outro lado, estudos realizados por Collins (2005), Valko e colaboradores (2007), Ferreira e colaboradores (2010), Benzie e Wachtel-Galor (2009) demonstraram a ação hipoglicemiante quando da administração dos cogumelos, não observado em nossos estudos.

5.4. Avaliação do desempenho gestacional

O sucesso de todas as gestações depende da formação correta da estrutura ramificada das vilosidades da placenta e da rede de vasos sanguíneos fetais no início da gravidez. Graves inadequações na formação da placenta sustentam muitos casos de falha de implantação e aborto espontâneo precoce (BOSS; CHAMLEY JAMES; 2018).

Por isso, alterações provocadas decorrentes do uso de composto durante o período gestacional podem ser indicio de tratar-se de uma substância teratogênica. A avaliação do desempenho gestacional foi determinada através de diversos parâmetros que estão descritos na tabela 5, considerando a exposição aos cogumelos durante os períodos de pré e pós implantação do concepto.

Tabela 5- Desempenho gestacional de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional.

	Cs	Ab_A	Ab_D	Gl_A	Gl_D
Sítios de implantação	12,2±1,5	13,8±1,5	11,5±1,5	13,3±1,5	11,5±1,6
Reabsorções precoces	0,7±0,6	0,8±0,6	0,3±0,5	0,3±0,6	0,5±0,5
Reabsorções tardias	0	0	0	0	0
Total de reabsorções	0,7±0,6	0,8±0,6	0,8±1,3	0,3±0,6	0,5±0,5
Fetos mortos	0	0	0	0	0,1±0,4
Fetos vivos	11,2±1,3	13±1,3	11±1,7	12,8±1,3	10,8±1,7

Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°).

A partir das contagens realizadas foram calculados os seguintes índices gestacionais apresentados como média ± desvio padrão (Tabela 6).

Tabela 6- Determinação dos índices gestacionais de ratas expostas aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* durante os períodos pré e pós-implantacional.

	Cs	Ab_A	Ab_D	Gl_A	Gl_D
Índice de Implantação	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0
Índice de Reabsorção	5,6±5,7	5,6±8,9	6,9±10,7	2,6±4,0	4,1±4,5
Índice de Mortalidade	2,4±4,1	0	0	1,3±3,1	1,2±2,9
Índice de perda embrionária antes da implantação	0	0	0	0	0
Índice de perda embrionária total	8,0±8,0	5,6±8,9	6,9±10,7	3,9±4,2	5,3±6,1
Índice de viabilidade embrionária	92,0±8,0	94,4±8,9	93,1±10,7	96,1±4,2	94,7±6,1

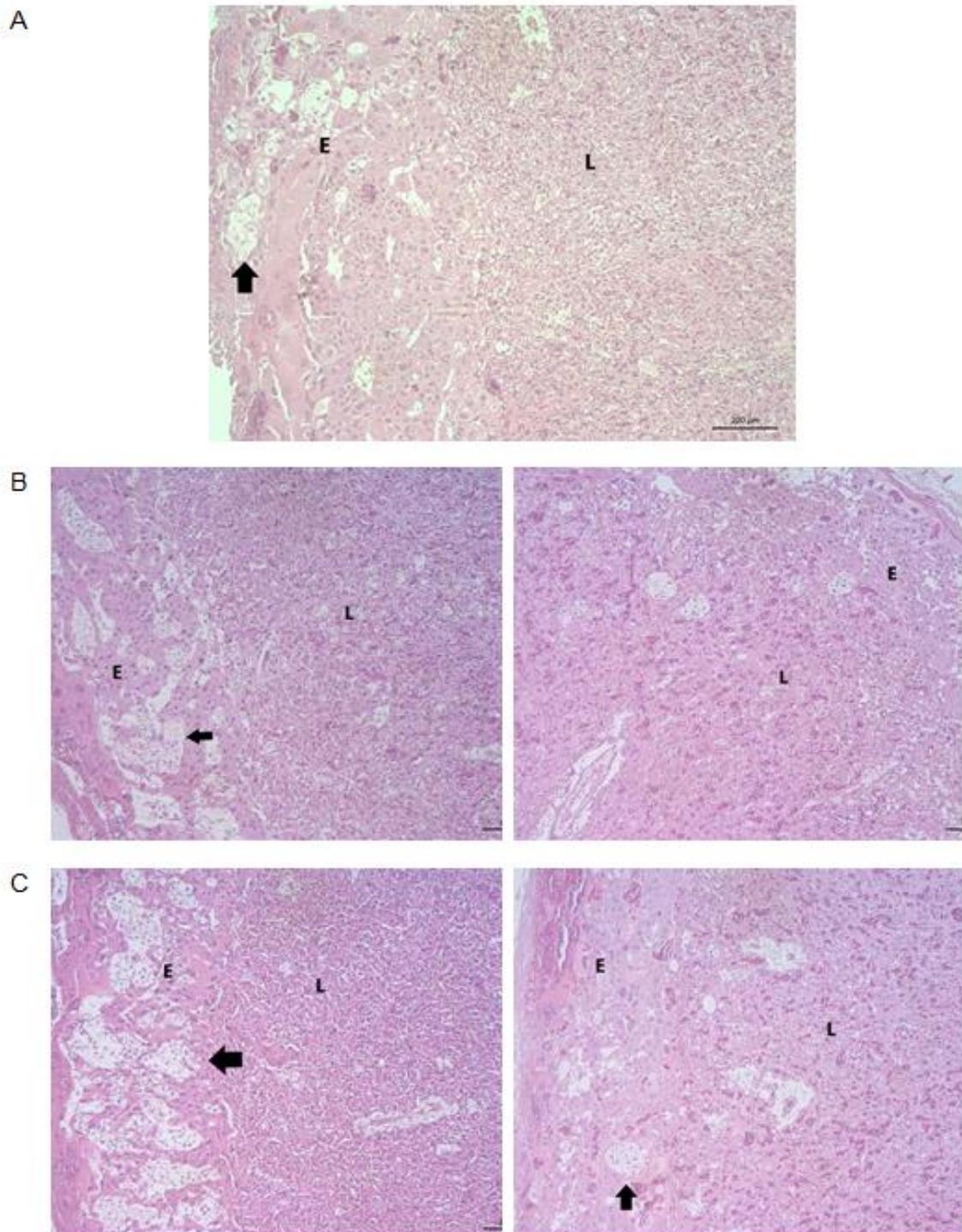
Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°).

Analisando estatisticamente os índices gestacionais determinados não houve diferença significativa entre o tratamento com os cogumelos nos períodos de pré e pós-implantação quando comparado ao controle.

5.5. Avaliação morfológica

A avaliação histológica da estrutura morfológica da placenta de ratas expostas aos cogumelos durante as fases de pré e pós-implantação do concepto é ilustrada na Figura 7.

Figura 7- Fotomicrografia (aumento de 50x) de corte histológico de placentas de ratas com coloração eosina/hematoxilina, com detalhe nas áreas: E: espongiotrofoblasto; L: labirinto, seta: indica as células produtoras de glicogênio.



Legenda: A) controle. B) *A. blazei* pré e pós-implantação. C) *G. lucidum* pré e pós-implantação.

A placenta é composta por três camadas com diferentes tipos de células em cada uma: (1) trofoblastos que cobrem toda a superfície da árvore vilosa e

se banham no sangue materno dentro do espaço interviloso; (2) células mesenquimais, macrófagos derivados do mesênquima (células de Hofbauer) e fibroblastos que estão localizados dentro do estroma do núcleo viloso entre trofoblastos e vasos fetais. As células de Hofbauer sintetizam fatores pró-angiogênicos que iniciam a vasculogênese na placenta; e (3) células vasculares fetais que incluem células do músculo liso vascular, células perivasculares (pericitos) e células endoteliais (WANG; ZHAO, 2010).

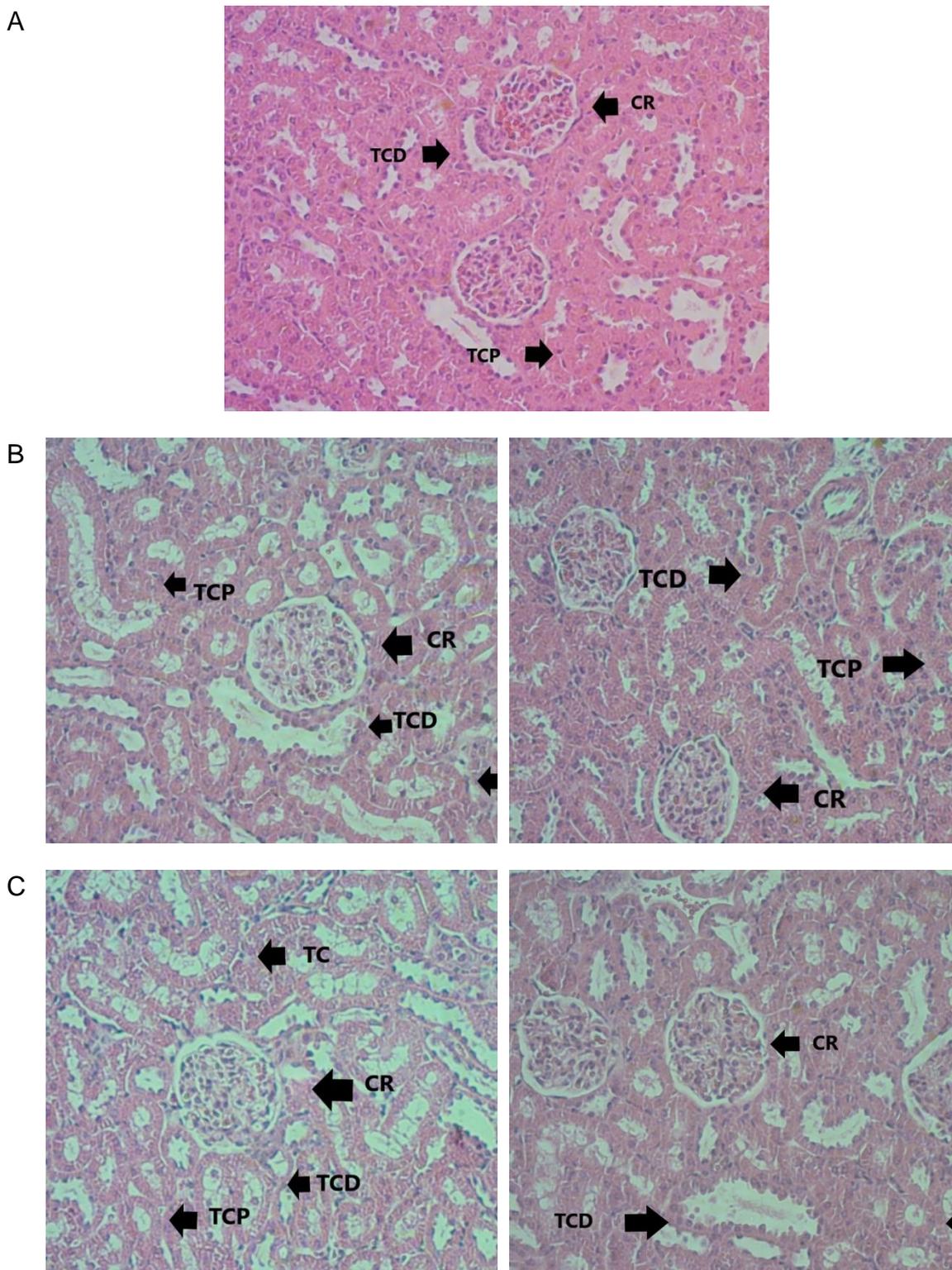
Depois que o blastocisto se implanta no endométrio materno, o trofoblasto se desenvolve para formar a camada externa da placenta. As células trofoblásticas proliferam e se diferenciam rapidamente para formar uma camada interna de células citotrofoblásticas e as células citotrofoblásticas se diferenciam e se fundem para formar uma camada externa de células sincitiotrofoblásticas multinucleadas que cobre a placenta. À medida que a placenta se desenvolve, as camadas do trofoblasto formam uma barreira placentária, onde uma camada de células separa o sangue materno no espaço interviloso do sangue fetal nas vilosidades (BROLIO et al., 2011).

Em resposta à implantação do blastocisto, o endométrio materno sofre uma reação decidual na qual as células do estroma decidual acumulam glicogênio e nutrientes e aumentam a função secretora para dar suporte ao embrião inicial (GUDE et al., 2004).

A partir da análise das figuras pode-se observar que a alteração encontrada foi apenas no tratamento com *G. lucidum* antes da implantação do conceito, em que houve um aumento na quantidade de células produtoras de glicogênio. Portanto, pode-se inferir que este cogumelo pode auxiliar na manutenção do conceito durante o desenvolvimento gestacional.

A Figura 8 corresponde aos cortes histológicos dos rins maternos expostos aos cogumelos nos períodos pré- e pós-implantacionais.

Figura 8- Fotomicrografias (aumento de 200x) de cortes longitudinais da região do córtex renal mostrando o túbulo contorcido distal (TCD), túbulo contorcido proximal (TCP ou TC) e o corpúsculo renal (CR) de animais controle e tratados. (A) Córtex renal de um rato de controle (B) Córtex renal do animal tratado com *A. blazei* pré e pós-implantação. C) Córtex renal do animal tratado com *G. lucidum* pré e pós-implantação.



Estudos usando plantas medicinais para o tratamento de várias doenças apresentam associação entre o uso e uma possível toxicidade renal (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Pois, uma função importante do rim é excretar resíduos metabólicos e xenobióticos da circulação. Durante esse processo, o rim pode se tornar vulnerável à toxicidade. As vias de eliminação de xenobióticos incluem filtração glomerular e secreção tubular (GEORGE et al., 2017).

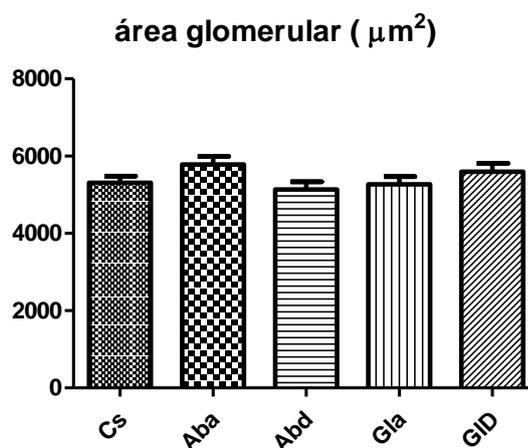
Poucos estudos mostram que alguns cogumelos apresentam potencial de nefrotoxicidade; como *Cortinarius orellanus* Fr. e outras espécies deste gênero que contêm uma biperidina, orelanina, responsável pela necrose letal-tubular (TEBBETT; CADDY, 1984).

Porém, neste estudo não foi observada alteração na anatomia renal materna, indicando que não houve comprometimento da filtração glomerular, que pode facilitar a ação teratogênica das substâncias.

5.6. Avaliação de alterações fisiológicas maternas

Na Figura 9 foram descritas as áreas (em μm^2) dos glomérulos renais de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós-implantação do concepto.

Figura 9- Área (μm^2) dos glomérulos renais de ratas expostas aos cogumelos durante os períodos pré e pós-implantacional.



Legenda: Cs (Controle - solução salina 0,9%), Ab_A (*A. blazei* 1°- 8°), Ab_D (*A. blazei* 9°-19°), Gl_A (*G. lucidum* 1°- 8°), Gl_D (*G. lucidum* 9°-19°).

Durante a gestação podem ocorrer alterações fisiológicas como aumento da diurese e do fluxo plasmático renal, que modificam o processo farmacocinético dos medicamentos, acarretando alterações na intensidade e duração do efeito dos fármacos, havendo necessidade de verificar os níveis plasmáticos que podem gerar efeitos danosos ao organismo da mãe e também do feto (WANNMACHER; FERREIRA, 1999).

Em nosso estudo, após a análise dos dados identificou-se que não houve diferença estaticamente significativa da área glomerular entre os diferentes tratamentos com os cogumelos, comparativamente ao grupo controle, constituindo assim um indicativo da segurança do uso destes cogumelos durante a gestação.

Além disso, a teratogenicidade pode estar relacionada a variante genética materna e fetal que afetam a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo, excreção, transporte placentário) e a ligação de um agente ao receptor (CASSINA et al., 2012), justificando desta forma a importância da avaliação fisiológica materna.

6. CONCLUSÃO

As ratas Wistar não sofreram efeitos deletérios perante a exposição aos cogumelos *A. blazei* e *G. lucidum* (100 mg/kg/dia) nos períodos de pré-implantação e implantação (1º ao 8º dia gestacional), nem no período pós-implantação (9º ao 19º dia gestacional), permitindo concluir que os cogumelos não causam toxicidade materna.

Os fetos, por sua vez, apresentaram uma redução crânio-caudal, frente à exposição materna a ambos os cogumelos, *A. blazei* e *G. lucidum*, impactando no peso ao nascimento, que se mostrou diminuído.

REFERÊNCIAS

ABRAMOV, J.P.; WELLS, P.G. Embryonic catalase protects against endogenous and phenytoin-enhanced DNA oxidation and embryopathies in acatalasemic and human catalase-expressing mice. **FASEB Journal**, v.25, n.7, p.2188-200, 2011.

ANDERSSON, H.C.; GRY, J. Phenylhydrazines in the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) - occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations. **TemaNord**, v. 558, p.1-123, 2004. Disponível em: <http://www.norden.org/pub/sk/showpub.asp?pubnr=2004:558>. Acesso em 25/01/2020.

ASSIS NETO, A.C.; et al. Initial development of bovine placentation (*Bos indicus*) from the point of view of the allantois and amnion. **Anatomy, Histology and Embryology**, v.38, n.5, p.341-47, 2009.

ASSMANN, G; NOFER, J.R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annual Review of Medicine**, v.54, n.1, p.321-41, 2003.

BAO, X.; et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohydrate Research**, v.332, n.1, p.67-74, 2001.

BATRA, P.; SHARMA, A.K.; KHAJURIA, R. Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.15, n.2, p.127-43, 2013.

BÉRARD, A.; et al. The French pregnancy cohort: medication use during pregnancy in the French population. **PloS One**, v.14, n.7, p.15-25, 2019.

BHASKAR, R.; MOHANTY, B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and *in vivo* analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. **General and Comparative Endocrinology**, v.205, p.226-34, 2014. Disponível em: 10.1016/j.ygcen.2014.02.007. Acesso em: 16/01/2020.

BERNARDSHAW, S.; et al. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of proinflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells *in vitro*. **Inflammation**, v. 29, n. 4-6, p. 147-53, 2006.

BENZIE, I.F.F.; WACHTEL-GALOR, S. Biomarkers of long-term vegetarian diets. **Advances in Clinical Chemistry**, v.47, n.1, p. 169-220, 2009.

BLAGOSKLONNY, M.V. Teratogens as anticancer drugs. **Cell Cycle**, v.4, n.11, p. 1518-21, 2005.

BOSS, A.L.; CHAMLEY, L.W.; JAMES, J.L. Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made? **Human Reproduction Update**, v.24, n.6, p.750-60, 2018.

BRASIL. Ministério Saúde. Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria** n.º 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades

Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília-DF, 1999.

BRASIL. Resolução SES nº1757, de 18 de fevereiro de 2002. Contra-indica o uso de Plantas Medicinais no Âmbito do Estado do Rio de Janeiro e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, 20 fev. 2002, v.27, n.33. Parte I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário Terapêutico Nacional 2010: **RENAME** 2010. 2a. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

BROLIO, M.P.; et al. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.4, p.222-32, 2010. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em:15/08/2020.

CARTER, A.M.; ENDERS, A.C. Placentation in mammals: definitive placenta, yolk sac and paraplacenta. **Therigenology**, v.86, n.1, p.278-86, 2016.

CARUSO, M.; EVANGELISTA, M.; PAROLINI, O. Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v.1, n.2, p.64-74, 2012.

CASSINA, M.; et al. Genetic susceptibility to teratogens: state of the art. **Reproductive Toxicology**, v.34, n.2, p.186-91, 2012.

CASTILHA, E.E.; ORIOLI, I.M. In: ECLAMC: The Latin-American collaborative study of congenital malformations. **Community Genetics**, v.7, n.2-3, p.76-94, 2004.

CASTRO, C.G.S.; et al. Uso indicado e uso referido de medicamentos durante a gravidez. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.1, p.73-82, 2004.

CETIN, I.; ALVINO, G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport: a review. **Placenta**, suppl. A, S77-S82, 2009.

CHAN, W.Y.; et al. The mushroom ribosome-inactivating protein lyophyllin exerts deleterious effect on mouse embryonic development *in vitro*. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, v.85, n.4, p.985-93, 2010.

CHRISTIAN, M.S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. **Principles and Methods of Toxicology**, p.1301-81, 2001. Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10026963247/>. Acesso em: 20/01/2020.

COLLINS, A.R. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v.41, n.13, p. 1923-30, 2005.

COUTINHO, L.N. Cultivo de espécies de cogumelo comestíveis. 2009.

Disponível em:

<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>. Acesso em 10 de Janeiro de 2020.

- CRIDER, K.S.; et al. Antibacterial medication use during pregnancy and risk of birth defects. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v.163, n.11, p. 978-85, 2009.
- DATHE, K.; SCHAEFER, C. The use of medication in pregnancy. **Deutsches Aerzteblatt Online**, v.116, n.46, p.783-90, 2019.
- DAS, K.P.; et al. Developmental toxicity of perfluorononanoic acid in mice. **Reproductive Toxicology**, v.51, p.133-44, 2015. Disponível em: 10.1016/j.reprotox.2014.12.012. Acesso em: 25/01/2020.
- DE OLIVEIRA, R.B.; et.al. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.434-41, 2011.
- DICKE, J.M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America**, v.73, n.3, p.567-82, 1989.
- DUONG, A.; et al. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. **Mutation Research**, v.728, n.3, p.118-38, 2011.
- ELMASTAS, M.; et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3-4, p.337-45, 2007.
- ESTEVEZ-PEDRO, N.M; et al. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.9, p.1-9, 2012.
- FATMAWATI, S.;_et al. The Inhibitory effect on aldose reductase by an extract of *Ganoderma lucidum*. **Phytotherapy Research**, v.23, n.1, p. 28-32, 2009.
- FATMAWATI, S.; KONDO, R.; SHIMIZU, K. Structure-activity relationships of lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lingzhi* as α -glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, n.21, p.5900-03, 2013.
- FERREIRA, I.; et al. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.10, n.5, p. 424-36, 2010.
- FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.149-54, 2005.
- GAWLIKOWSKI, T.; ROMEK, M.; SATORA, L. Edible mushroom-related poisoning: A study on circumstances of mushroom collection, transport, and storage. **Human and Experimental Toxicology**, v.34, n.7, p.718-24, 2015.
- GEMMA, S.; VICHI, S.; TESTAI, E. Metabolic and genetic factors contributing to alcohol induced effects and fetal alcohol syndrome. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.31, n.2, p.221-9, 2007.
- GEORGE, B.; et al. Xenobiotic transporters and kidney injury. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.116, p.73-91, 2017.
- GERENUTTI, M.; DEL FIOL, F.; GROppo, F.C. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. **Die Pharmazie**, v.61, n.1, p.79-80, 2006.

GERENUTTI, M.; et al. Reproductive performance and embryotoxicity of rats exposed to carbamazepine. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.3, p.509-14, 2008.

GERENUTTI, M., et al. Safety assessment of the royal sun mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher basidiomycetes) intake during rat pregnancy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.16, n.6, p.519–28, 2014.

GIAVINI, E.; MENEGOLA, E. Biomarkers of teratogenesis: suggestions from animal studies. **Reproductive Toxicology**, v.34, n.2, p.180-5, 2012.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J.P. Fetal nutrition and adult disease. **American Journal Clinical Nutrition**, v.71, suppl. 7, p.S1344-52, 2000.

GONZALES, J.R.; et al. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). **Revista Peruana Biología**, v.13, n.3, p.223-5, 2006.

GUDE, N.M.; et al. Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis Research**, v.114, n.4-5, p.397-407, 2004.

HAGGARTY, P.; et al. Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. **Placenta**, v.23, n.1, p. 86-92, 2002.

HARKNESS S.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo, Livraria Roca, 1993.

HASHIMOTO, S.; et al. Effect of culture conditions on chemical composition and biological activities of *Agaricus brasiliensis*. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.8, n.4, p.329-42, 2006.

HEITMANN, K.; NORDENG, H.; HOLST, L. Safety of ginger use in pregnancy: results from a large population- based cohort study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.69, n.2, p. 269-77, 2013.

HSU, C.H.; et al. The mushroom *Agaricus Blazei* Murill in combination with metformin and gliclazide improves insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.13, n.1, p.97-102, 2007.

JIA, J.; et al. Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. **Food Chemistry**, v.115, n.1, p.32-36, 2009.

JO, W-S.; HOSSAIN, A.; PARK, S-C. Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms. **Mycobiology**, v.42, n.3, p.215-20, 2014.

KABIR, Y.; KIMURA, S.; TAMURA, T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.34, n.4, p.433-38, 1988.

KALTER, H. Teratology in the 20th century. Environment causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicology and Teratology**, v.25, n.2, p.131-282, 2003.

KAWAMURA, M.; KASAI, H. Delayed cell cycle progression and apoptosis induced by hemicellulase: treated *A. blazei*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.4, n.1, p.83-94, 2006.

KEBER, R.; et al. Mouse knockout of the cholesterologenic cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (Cyp51) resembles Antley-Bixler syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.33, p.29086-97, 2011.

KEELER, R.F. Teratogens in Plants. **Journal of Animal Science**, v.58, n.4, p.1029-39, 1984.

KIM, Y.W.; et al. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology Letter**, v.27, n.7, p.483-87, 2005.

KIMURA, Y; et al. Isolation of an anti-angiogenic substance from *A. blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. **Cancer Science**, v.95, n.9, p.758-64, 2004.

KINO, K.; YAMASHITA, A.; YAMAOKA, K. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.1, p.472-8, 1989.

KINO, K.; et al. Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v.13, n.8, p.1109-15, 1991.

KOREN, G.; ORNOY, A. The role of the placenta in drug transport and fetal drug exposure. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.11, n.4, p.373-85, 2018.

KUO, Y.C. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, n.3, p.176-87, 2002.

LEMONICA, I.P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 1. ed., São Paulo, Atheneu, 1996.

LEMOS, D.C.S.; et al. Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curtume. **Multi-Science Journal**. v.1, n.3, p.56-63, 2015.

LIU, Y.; et al. Immunomodulating activity of *Agaricus brasiliensis* KA21 in mice and in human volunteers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, p.205-19, 2008.

LONDERO, P.M.G.; RIBEIRO, N.D.; CARGNELUTTI FILHO, A. Teores de fibra e rendimento de grãos em populações de feijão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.167-73, 2008.

LU, L.; et al. Safety assessment of the fermented *Phylloporia ribis* (*Lonicera japonica* Thunb.) mycelia by oral acute toxicity study in mice and 90-day feeding study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.69, p.18-24, 2014. Disponível em: 10.1016/j.fct.2014.03.044. Acesso em: 25/01/2020.

LUNARDI, T.M.; SCHUELTER, F.T.; GALATO, D. Uso de medicamentos no primeiro trimestre de gravidez: avaliação da segurança dos medicamentos e uso de ácido fólico e sulfato ferroso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.36, n.12, p.541-47, 2014.

MA, H.T; et al. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v.114, p.109-13, 2015.

MAU, J.L.; LIN, H.C.; CHEN, C.C. Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.21, p.6072-77, 2002.

MENEGOLA, E.; et al. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. **Birth Defects Research Part B**, v.74, n.5, p.392-8, 2005.

MIZUNO, T. Bioactive substances and medicinal effects of the Reishi, 2004. Disponível em: <http://www.toi-reishi.com>. Acesso em: 25/01/2020.

MOORE, L.K.; PERSAUD, T.V.N. Defeitos congênitos humanos. In **Embriologia Clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 173-205. 2008.

MUKERJI, P.; et al. Oral repeated-dose systemic and reproductive toxicity of 6:2 fluorotelomer alcohol in mice. **Toxicology Reports**, v.2, p.130-43, 2015. Disponível em: 10.1016/j.toxrep.2014.12.002. Acesso em 25/01/2020.

NG, T.B.; et al. Differential abilities of the mushroom ribosome-inactivating proteins hirsutin and velutin to perturb normal development of cultured mouse embryos, **Toxicology in vitro**, v.24, n.4, p.1250-57, 2010.

NIWA, A.; TAJIRI, T.; HIGASHINO, H. Ipomoea batatas and *Agaricus blazei* ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potential in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.48, n.3, p.194-202, 2011.

OKA, Y.; et al. Increased liver glucose-transporter protein and mRNA in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v.39, n.4, p.441-46, 1990.

OLSON, J.A.; et al. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. **Medical Mycology**, v.53, n.2, p.107-18, 2015.

ORSINE, J.V.C.; BRITO, L.M.; NOVAES, M.R.C.G. Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e farmacológicas. **Revista HCPA**, v.32, n.4, p.452-60, 2012.

PASTUSAZK, A.L.; et al. Misoprostol use during pregnancy is associated with increased risk for Mobius sequence. In: MEETING OF THE TERATOLOGY SOCIETY, Londres. **Teratology - The Journal of Abnormal Development**. New York: Wiley-Liss, p.36., 1997.

PATERSON, R.R.M. Ganoderma: a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v.67, n.18, p.1985-2001, 2006.

RAHAR, S; et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research**, v.2, n.2, p.94-103, 2011.

RAMOS, J.L.A.; et al. Malformações Congênitas: Estudo prospectivo de dois anos em três maternidades de São Paulo. **Pediatria**, v.3, n.1, p.20-8, 1981.

RANDAZZO-MOURA, P.; et al. The effect of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Snethlage (Embauba) in the rat fetal development. **Chinese Medicine**, v.2, n.3, p.115-19, 2011.

RANGEL, M.; BRAGANÇA, F.C.R. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.1, p.100-09, 2009.

RIQUELME, G. Placental chloride channels: a review. **Placenta**, v.30, n.8, p.659-69, 2009.

RODRIGUES, H. G.; et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p.359-66, 2011.

SALEWSKY, E. Farbemethode zum markroskopinhennachweis von implantatconsstellen am uterus der ratter. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 247, n.1, p. 367-72, 2006.

SANCHEZ, P.; et al. Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. **Cancer Research**, v.65, n.8, p.2990-92, 2005.

SAWAMURA, K.; SUZUKI, Y.; SOMEYA, T. Effects of dosage and CYP2D6-mutated allele on plasma concentration of paroxetine. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.60, n.8, p.553-7, 2004.

SCHAFER, Z.T.; et al. Enhanced sensitivity to cytochrome c-induced apoptosis mediated by papi in breast cancer cells. **Cancer Research**, v.66, p.2210-8, 2006.

SCHEMMELE, K.E.; PADIYARA, R.S.; D'SOUZA, J.J. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. **Journal of Diabetes its Complications**, v.24, n.5, p.354-60, 2010.

SCHÜLLER-FACCINI, L.; SCHVARTZMAN, L.; CECCHIN, C. Teratogênese humana e o SIAT. In: Sanseverino MT, Spritzer D, Schüller-Faccini L, organizadores. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: Editora da Universidade; pp.11-7, 2001.

SILVA, S. L.; et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **ACTA AMAZONICA**, v.46, n.1, p.73-80, 2016.

SIMIONI, D.; JOSEFINO, L.; RODRIGUES, M. Caracterização de corpos de frutificação e substrato miceliado do cogumelo *Ganoderma lucidum*. **Synergismus Scyentifica**, UTFPR , Pato Branco, v.3, n.4, p.1-3, 2008.

SMITHELLS, R.W. The challenges of teratology. **Teratology**, v.22, n.1, p.77-85, 1980.

SONG, Y.S.; et al. Antiangiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.17-20, 2004.

SORIMACHI, K; et al. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *A. blazei* fractions *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v.26, n.2, p.103-108, 2001.

SOUSA, M.P.; et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2.ed. Fortaleza: Editora UFC, 448p., 2004.

SUN, J.; HE, H.; XIE, B.J. Novel Antioxidant Peptides from Fermented Mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.21, p.6646-52, 2004.

TEBBETT, I.R.; CADDY, B. Mushroom toxins of the genus *Cortinarius*. **Experientia**, v.40, n.5, p. 441-46, 1984.

TENG, B.S.; et al. Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.16, n.2, p.166-75, 2012.

TEOW, S.S. The effective application of *Ganoderma* nutraceuticals. In: Recent Progress in *Ganoderma lucidum* Research; Kim, B.K., Moon, C.K., Kim, T.S., Eds.; **Pharmaceutical Society of Korea**: Seoul, South Korea, 1; pp. 21-39, 1997.

TOTH, B. Carcinogenic fungal hydrazines. **In Vivo**, v.5, n.2, p.95–100, 1991.

TSAI, S.; TSAI, H.; MAU, J. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Leben smittel Wissen schaft und Technologie – Food Science and Technology**, London, v.40, n.8, p.1392-402, 2007.

URBEN, A.P; et al. Mushrooms production by means of modified Chinese technology. Brasília: **EMBRAPA**, 2001.

URBEN, A.F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2. Ed. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2004.

VALKO, M.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VIROEL, F.J.M. Estudos pré-clínicos do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): evidências no diabetes mellitus gestacional. **Artigo**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, 2018.

WANG, A.C.; LI, B. *Ganoderma*; Beijing Science and Technology Press: Beijing, China (in Chinese). Metastatic inefficiency. **Advance Cancer Research**, v.10, n.4, p.1057-62, 2002.

WANG, Y.; ZHAO, S. **Vascular Biology of the Placenta**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. Uso de fármacos durante gestação e lactação. In: Wannmacher L, Ferreira MBC (eds.). **Farmacologia Clínica para Dentistas**. 2 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, pp. 270-3, 1999.

WASSER, S.P.; et al, **Encyclopedia of Dietary Supplements**. New York: Marcel Dekker. Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*), pp. 680–90, 2005.

WERLER, M.M.; LOUIK, C.; MITCHELL, A.A. Case–control studies for identifying novel teratogens. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v.153C, n.3, p.201-8, 2011.

WERLER, M.M. Congenital Malformations and Consequential Epidemiology. **Current Epidemiology Reports**, v.2, n.1, p.8–12, 2014.

WU, H.; et al. Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.78, n.6, p.1085-91, 2003.

YANG, Q. HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, n.2, p.167-72, 2010.

ZHAO, J.; LI, P.; HU, Y. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on reducing blood sugar in mice with diabetes. **Journal of North China Coal Medical College**, v.8, p.287-88, 2006. Disponível em: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-MTYX200603004.htm. Acesso em: 20/01/2020.

ZHANG, H.N.; et al. *In vitro* and *in vivo* protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. **Life Sciences**, v.73, n.18, p.2307-19, 2003.

ZHANG, H.N.; LIN, Z.B. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.25, n.2, p.191-5, 2004.

ZHU, L.N.; et al. Isolation, purification, and immunological activities of a low-molecular-weight polysaccharide from the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.15, n.4, p.407-14, 2013.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 CEUA-UNISO
 PARECER

Protocolo n° 089/2016
Interessado (a): Marli Gerenutti
Orientador (a): Marli Gerenutti
Título do Projeto: Ensaios Pré-Clinicos com os Cogumelos <i>Agaricus blazei</i> , <i>Lentinula edodes</i> e <i>Ganoderma lucidum</i> , visando a redução e danos maternos e fetais causados pelo diabetes gestacional
Título do Experimento: o mesmo

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

APROVADO.

APROVADO com RECOMENDAÇÃO, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

COM PENDÊNCIA, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

REPROVADO

Manifestação do Parecerista:

Nome: Renata de Lima

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 11/08/2016

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica