

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

ROVENA JACOBSEN SARTER

**INFLUÊNCIA DO USO DE GELEIA REAL SOBRE A
GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR AGENTE ALQUILANTE EM
CAMUNDONGOS**

CRICIÚMA

2020

ROVENA JACOBSEN SARTER

**INFLUÊNCIA DO USO DE GELEIA REAL SOBRE A
GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR AGENTE ALQUILANTE EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Vanessa Moraes de Andrade

CRICIÚMA

2020



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – N° 348

Com início às 14h (quatorze horas) do dia vinte e oito de maio de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital Google Meet, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **ROVENA JACOBSEN SARTER**, sob a orientação da **Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade** intitulada **"INFLUÊNCIA DO USO DE GELEIA REAL SOBRE A GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR AGENTE ALQUILANTE EM CAMUNDONGOS"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Paula Rohr (Universidade Luterana do Brasil - ULBRA) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 28 (vinte e oito) de maio de 2020 (dois mil e vinte).

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S249i Sarter, Rovena Jacobsen.
Influência do uso de geleia real sobre a
genotoxicidade induzida por agente alquilante em
camundongos / Rovena Jacobsen Sarter. - 2020.
45 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do
Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.
Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

1. Geleia real - Uso terapêutico. 2.
Genotoxicidade. 3. Mutagenicidade. 4.
Antioxidantes. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.36

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a Resolução N.07/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) do PPGCS da UNESC.

Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas, primeiramente à Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. Aos meus pais, irmã, noivo e a toda minha família que, com tanto carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu grande amor, por ter me dado além de saúde, força e fé para superar as dificuldades, pessoas que por meio Dele me ajudaram e me confortaram nos momentos felizes e difíceis;

Aos meus pais, Arilson e Alcenir, pelo amor, carinho e dedicação para que essa jornada fosse a melhor possível e por me darem força para nunca desistir dos meus sonhos. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu noivo, Luiz Antônio, meu grande incentivador e companheiro de vida. Obrigada por todas palavras carinhosas, apoio e amor durante todo esse caminho. Você foi essencial!

As minhas primas, companheiras de apartamento, Sabrina e Gabriele pelo apoio, companheirismo e amizade durante todo esse período.

A todos os professores do PPGCS, que por meio das aulas e conversas compartilharam não somente conhecimento e pesquisa, mas também contribuíram para minha formação pessoal.

A minha orientadora Vanessa Moraes de Andrade, por compartilhar seus conhecimentos e pelo direcionamento em todas as etapas desta pesquisa, além da paciência e companheirismo, você foi essencial. Muito obrigada por tudo!

A todos os integrantes do GPGTOX, que participaram e trabalharam junto deste trabalho com muita dedicação.

A Angela, Ligia, Luiza, Adriani, que participaram do experimento, muito obrigada por toda dedicação, vocês foram essenciais nesse processo.

A Marina, que sempre esteve disponível para me ajudar. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, me auxiliar em todas os processos do laboratório e por estar sempre presente durante todas as etapas de correção e contribuições desse trabalho. Muito obrigada por tudo!

A todos os colegas do MINTER - Mestrado Interinstitucional na área da Saúde por todas contribuições, aprendizados e amizade.

Aos amigos que o mestrado me deu, Dayane, Rusilania, José Marcelo e Lia. Muito obrigada pelos bons momentos e conversas durante esse período. O carinho de vocês foi muito importante!

Aos animais que involuntariamente cederam à vida em prol do conhecimento científico.

O Centro Universitário do Espírito Santo -UNESC pela oportunidade de realizar minha graduação e mestrado. E em especial a UNESC-SC pela oportunidade, através da parceria firmada com o UNESC-ES para ser oferecido o MINTER - Mestrado Interinstitucional na área da Saúde.

A banca examinadora pelo tempo, leitura e colaboração para este trabalho que fizeram parte da minha formação.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste sonho, o meu muito obrigado.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota. ”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Introdução: A geleia real (GR) é um líquido branco-amarelado e cremoso secretado pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas (*Apis mellífera* L.) para nutrição de larvas jovens na colônia e da abelha rainha. Essa substância apresenta componentes com importantes propriedades biológicas, funcionais e terapêuticas. Evidências apontam que a GR apresenta um potencial antioxidante, no entanto, pouco se sabe em relação a genotoxicidade e antigenotoxicidade da mesma. Estudos recentes têm associado as funções alegadas à GR à proteção de danos causados no DNA, no entanto, ainda são escassas as pesquisas que relatam as doses adequadas e seu mecanismo de ação protetivo e/ou reparador no material genético. Levando em consideração a necessidade de aprofundar as pesquisas sobre o assunto, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in vivo* o efeito da geleia real liofilizada sobre a genotoxicidade induzida pelo agente alquilante metil metanosulfonato (MMS).

Materiais e métodos: Foram utilizados 66 camundongos Swiss de 60 dias de idade, obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Foram divididos em 11 grupos, com 6 camundongos por grupo. O experimento foi realizado através da administração de geleia real liofilizada (nas doses de 150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg) e água por meio de gavagem, como pré-tratamento e pós-tratamento ao agente alquilante MMS (40mg/Kg) administrado por via intraperitoneal, comparados respectivamente em 24h e 48h. Após os tratamentos, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais através de incisão na extremidade da cauda para a realização do Ensaio Cometa nos tempos de 24h e 48h. Após a última coleta os animais foram submetidos a eutanásia e foi retirada a medula óssea para o Teste de Micronúcleos (MN). **Resultados:** Nos grupos de receberam a GR como pré-tratamento, a melhor dose foi a dose de 150mg/kg, apresentando ação antigenotóxica. Já no pós-tratamento todas as doses apresentaram redução nos danos causados no DNA pelo MMS, sendo a dose de 1000mg/kg a melhor, pois à medida que a dose aumentava diminuía o dano no DNA. Em relação a atividade antimutagênica, observou-se que não houve diferença significativa no pré-tratamento com GR e a formação de micronúcleos pelo MMS. Já no pós-tratamento com GR, houve uma correlação negativa em relação aos danos causados pelo MMS, uma vez que, quanto maior a dose de GR (1000mg/kg), menor o número de micronúcleos nos eritrócitos

policromáticos. **Conclusão:** A GR utilizada neste estudo, independente da dose, não apresentou ação genotóxica. Além disso, não apresentou ação mutagênica quando observamos os grupos que ingeriram GR nas três doses avaliadas através do Teste de MN. Foi observado que a GR no modelo de pré-tratamento apresentou ação antigenotóxica, sendo a melhor dose a de 150mg/kg. Já no pós-tratamento, todas as doses apresentaram redução dos danos causados no DNA, sendo a dose de 1000mg/kg a melhor. E da mesma forma, no ensaio de antimutagênese, a GR apresentou uma correlação significativa em relação a aumento de dose x diminuição do dano.

Palavras-chave: Geleia Real; Genotoxicidade; Mutagenicidade; Antioxidante;

ABSTRACT

Introduction: Royal Jelly (RJ) is a yellowish-white and creamy liquid secreted by the mandibular and hypo pharyngeal glands from bees (*Apis mellifera* L.) to nourish the young larvae from the colony and the queen bee. This substance contains important components with important biological, functional and therapeutic properties. A potential antioxidant is shown in evidences, but little is known about the relation between genotoxicity and antigenotoxicity. Recent studies have associated functions to RJ and the protection to DNA damage, however research in this area which relates adequate doses and its mechanism of protective and/or repairer action in genetic material is little. Taking the necessity to make further research about this subject into consideration this paper aims to assess the *in vivo* effect from RJ in freeze-dried about the genotoxicity induced by alkylating methyl methane sulfonate (MMS). **Methods and Material:** 66 Swiss mice, 60 days old from the vivaria in the Extremo Sul Catarinense University were used and divided into 11 groups, each group with 6 mice. The experiment was through the intake of freeze-dried RJ (150mg/kg, 300mg/kg and 1000mg/kg) and water through gavage; pre-treated and post-treated to the alkylating MMS (40mg/kg) conducted via intraperitoneal compared in 24 and 48 hours respectively. Blood samples were collected from every animal by an incision in the end of their tail after the treatment to the Single Cell Gel Electrophoresis within 24 and 48 hours. After the last picking from the animals they were euthanized and their bone marrow cells were taken to the micronuclei test (MN). **Results:** In groups pre-treated with RJ the best dosage was 150mg/kg, reporting an antigenotoxic action. In post-treated groups all the dosages reported a reduction in damages caused to DNA by MMS; the 1000mg/kg was the best dosage as the increase of dosage diminished the damages to the DNA. In relation to antimutagenic activity there were no significant differences observed in the pre-treatment with RJ and the micronuclei formation through MMS. However, in post-treatment with RJ there was a negative correlation among the damages caused by MMS as the bigger the RJ dosage (1000mg/kg) the smaller the number of micronuclei in polychromatic erythrocytes. **Conclusion:** Royal Jelly which was used in this study despite of its dosage did not present genotoxic action. Besides that, it did not present any mutagenic action while observed in groups which took RJ in three doses assessed through the MN test. In pre-treatment, RJ

presented antigenotoxic action and the best dosage was 150 mg/kg and in post-treatment all dosage presented reduction in damage caused to the DNA, in this case the best dose was 1000 mg/kg. The antimutagenic experiment with RJ presented a significant correlation to the increase of dosage versus the diminishment of damages.

Key Words: Royal Jelly; Genotoxicity; Mutagenicity; Antioxidant;

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico, induzidos por água, geleia real (150mg/kg; 300mg/kg e 1000mg/kg) e pelo agente alquilante metil metanosulfonato (MMS).. ...	23
Figura 2. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico de camundongos tratados com metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratados com geleia real (GR). A:150mg/kg; B: 300mg/kg; C: 1000mg/kg.).	25
Figura 3. Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre os danos no DNA do metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratamento com geleia real (m/kg) medidos pelo parâmetro de Tail Intensity (%) (n=6 animais por grupo).	26
Figura 4. Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o número de micronúcleos em EPC (eritrócitos policromáticos) do metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratamento com geleia real (m/kg) medidos pelo (%) (n=6 animais)	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho experimental de avaliação de genotoxicidade: Tempo de administração das diferentes doses de geleia real, coleta de sangue e eutanásia dos animais.....	18
Tabela 2. Desenho experimental de antigenotoxicidade: Tempo de administração das diferentes doses de geleia real, coleta de sangue e eutanásia dos animais.....	19
Tabela 3. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos suplementados com Geleia Real em diferentes doses e administração de Metil metanosulfonato (MMS) via intraperitoneal.....	27
Tabela 4. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos que receberam pré-tratamento com Geleia Real em diferentes doses e administração de Metil metanosulfonato (MMS) via intraperitoneal	28
Tabela 5. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos que receberam pós-tratamento com Geleia Real em diferentes doses e administração de Metil metanosulfonato (MMS) via intraperitoneal.....	28

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

10-H2DA: Ácido trans-10-hidroxi-2-decenóico

10HDA: Ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico

10-HDAA: Ácido 10-hidrovidecanóico

ALT: Alanina Aminotransferase

CA: Aberração cromossômica

CAT: Catalase

CDDP: Cisplatina

CP: Ciclofosfamida

DMT2: Diabéticas do tipo 2

DR: Redução de danos

DOX: Doxorubicina

DPPH: 1-difenil-2-picrilhidrazila

ENC: Eritrócitos normocromáticos

ENCMn: Eritrócitos normocromáticos micronucleados

EPC: Eritrócitos policromáticos

EPCMn: Eritrócitos policromáticos micronucleados

GPx: Glutaciona peroxidase

GR: Geleia Real

GSH: Glutaciona reduzida

GST: Glutaciona -S-Transferase

MDA: Malondialdeído

MMS: Metil metanossulfonato

MNNG: N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

MNU: Metilnitrosourea

NO: Óxido nítrico

SEA: Ácido sebáceo

SEM: Etil metanossulfonato

SOD: Superóxido dismutase

VPA: Ácido valpróico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	5
1.1	BENEFÍCIOS DE PRODUTOS APÍCULAS.....	5
1.1.1	Geleia Real	7
1.2	GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE.....	11
2.	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	16
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
3.2.1	Grupos Experimentais	16
3.3	ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	19
3.3.1	Ensaio Cometa	20
3.3.2	Teste De Micronúcleos (MN)	21
3.3.3	Percentual de Redução de Danos (DR%)	21
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5.	RESULTADOS	23
5.1	ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DA GELÉIA REAL ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.....	23
5.2	ANÁLISES DA ANTIGENOTOXICIDADE DA GELEIA REAL ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.....	24
5.3	MUTAGENICIDADE DA GELEIA REAL.....	26
5.4	ANTIMUTAGENICIDADE DA GELEIA REAL.....	27
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÃO	37
8.	REFERÊNCIAS	38

9.	ANEXOS	44
9.1	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO DOS ANIMAIS (CEUA)	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 BENEFÍCIOS DE PRODUTOS APÍCULAS

Segundo Pasupuleti et al. (2017) os últimos anos presenciaram uma rápida ascensão da utilização dos produtos obtidos de colmeias de abelhas, como mel, pólen de abelha, própolis e geleia real, em virtude de suas propriedades farmacológicas. Atualmente muitos estudos estão voltados na investigação dos benefícios destes para a saúde, gerando o desenvolvimento de nutracêuticos e alimentos funcionais.

Os produtos das abelhas são compostos por numerosas substâncias conhecidas há muito tempo por suas propriedades medicinais e de promoção da saúde, uma vez que eram utilizados na antiguidade e na Idade Média. Na China antiga, o pólen de abelha era utilizado como um ativo cosmético que auxiliava no clareamento da pele. Atualmente, vem sendo aplicado em um ramo da medicina complementar e alternativa denominada apiterapia (Kocot et al., 2018).

O pólen de abelha foi descrito como um produto apiterápico, devido ao seu potencial terapêutico. O extrato do pólen coletado de diferentes tipos de flores pode ser considerado um alimento capaz de melhorar a suplementação nutricional e terapêutica, e isso devido a suas propriedades biológicas, como o alto teor de flavonoides e polifenóis (Denisow e Denisow-Pietrzyk, 2016). Os principais compostos químicos do pólen de abelha incluem carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, enzimas, coenzimas, vitaminas e minerais. No entanto, a composição química do pólen de abelha é altamente variável, dependendo da fonte, região geográfica e condições climáticas, afetando profundamente suas propriedades biológicas e terapêuticas (Cornara et al., 2017).

Outro produto das abelhas muito utilizado é o própolis, um produto com amplas propriedades biológicas que se caracteriza por ser uma substância resinosa preparada para selar as rachaduras, manter a umidade e a temperatura da colmeia estável durante todo o ano. O própolis bruto é tipicamente composto por 50% de resinas de plantas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias orgânicas. Assim, o própolis é amplamente utilizado para prevenir e tratar resfriados, feridas, úlceras, reumatismo, entorses, doenças cardiovasculares, diabetes e cárie dentária devido às suas diversas propriedades

biológicas, como anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral e antiulcerador (Huang et al., 2014).

Assim como o própolis, outro produto das abelhas muito utilizado é o mel, uma substância natural que as abelhas produzem a partir do néctar de flores, fazendo com que sua composição esteja intimamente relacionada à sua origem botânica, ao processamento e às condições ambientais (Cianciosi et al., 2018).

Desde a antiguidade, o mel era usado como um medicamento para estimular a cicatrização de feridas, regeneração dos tecidos e para o alívio de distúrbios gastrointestinais, gengivite e várias outras patologias. Esse efeito terapêutico se deve à presença de várias moléculas antioxidantes, incluindo compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos (Alvarez-Suarez et al., 2010; Al-Waili et al., 2014). Atualmente, também tem sido descrito os efeitos antimicrobiano, antiviral, antifúngico, anticancerígeno e protetor no sistema cardiovascular, nervoso e respiratório (Alvarez-Suarez et al., 2013).

Em especial, entre todos os produtos apícolas que tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, devido aos seus compostos apresentarem importantes propriedades biológicas e terapêuticas, um que se destaca é a geleia real (GR). A GR é um líquido branco-amarelado e cremoso secretado pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas (*Apis mellífera* L.) para nutrição de larvas jovens na colônia e da abelha rainha, uma vez que apresenta componentes com importantes propriedades biológicas, funcionais e terapêuticas. Então a GR vem sendo utilizada desde a antiguidade, na Grécia antiga, para aumentar a longevidade, uma vez que seu uso estava atribuído a melhora da capacidade intelectual e força física. Além disso, a GR era utilizada no antigo Egito em cosméticos, sendo relacionada ao símbolo de beleza e força. Na Ásia, especificamente na China, a GR vem sendo utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade, uma vez que era produzida exclusivamente nos jardins soberanos e correlacionada com a longevidade e a força sexual. Embora o seu uso seja muito antigo, pouco se sabe dos seus benefícios à saúde humana, informações de seus nutrientes e qual a dose adequada para os reportados benefícios da mesma (Fratini et al., 2016).

1.1.1 Geleia Real

A GR é o alimento exclusivo da larva da abelha rainha (*Apis Milífera* L.). Quimicamente, é composta por componentes com importantes propriedades biológicas e funcionais, apresentando em sua composição água (50% a 60%), proteínas (18%), carboidratos (15%), lipídios (3% a 6%), sais minerais (1,5%) (Viuda-Martos et al., 2008; Delkhoshe-Kasmaie et al., 2014), vitaminas principalmente tiamina, niacina, riboflavina, ácido fólico, biotina, piridoxina e quantidades menores de vitamina C, D, A e E (Azab et al., 2011; Khazaei et al., 2017), aminoácidos livres e substâncias bioativas como o ácido 10-hidroxi-trans-2-decenóico (10HDA) (Viuda-Martos et al., 2008). Ainda, estudos tem revelado a presença de outros oligossacarídeos, como trealose, maltose, gentiobiose, isomaltose, rafinose, erlose e melezitose (Kocot et al., 2018).

Caracterizada por proporcionar uma nutrição exclusiva para todas as larvas desde a eclosão até o terceiro dia de vida, as larvas selecionadas para se desenvolverem em rainhas continuam sendo alimentadas com a GR durante toda a vida, o que impacta significativamente no tempo de vida da abelha rainha, que pode viver até cinco anos, enquanto uma abelha operária vive em torno de 45 dias. Durante estes 5 anos acredita-se que a abelha rainha alimentada com GR pode desovar em um dia o equivalente ao seu peso, aproximadamente 2000 a 3000 ovos (Fratini et al., 2016).

As pesquisas sugerem que um dos componentes da GR, a royalactina, seja responsável pela mudança morfológica de uma larva para abelha rainha. De acordo com Pasupuleti et al. (2017) este superalimento é também o principal responsável pela longevidade da rainha comparado com as abelhas operárias. Recentemente, foi demonstrado que a royalactina seria a proteína capaz de induzir a diferenciação da larva selecionada para se tornar abelha rainha através de uma via de sinalização mediada por receptores do fator de crescimento epidérmico, aumentando o tamanho do corpo e o desenvolvimento dos ovários (Kamakura et al., 2011).

Segundo Ramadan e Al-Ghamdi (2012), atualmente a GR vem sendo utilizada em cosméticos, alimentos saudáveis, e produtos farmacêuticos, devido às suas atividades farmacológicas e terapêuticas como ação antioxidante (Delkhoshe-Kasmaie et al., 2014; Ghanbari et al., 2016), antienvelhecimento (Park et al., 2012), anti-inflamatória (Kohno et al., 2004; Arzi et al., 2015), antibacteriana (Tseng et al.,

2010) anti-hipertensiva (Tokunaga et al., 2004), imunomoduladora (Zhang et al., 2017), hipogliceminante, antitumoral, antifadiga e cicatrizante (Delkhoshe-Kasmaie et al., 2014).

A composição lipídica da GR compreende 80-85% de ácidos graxos, sendo o ácido trans-10-hidroxi-2-decenóico (10-H2DA), o ácido 10-hidrovidecanóico (10-HDAA) e o ácido sebáceo (SEA), os três principais. Acredita-se que o ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10H2DA) desempenha funções importantes em várias atividades biológicas, incluindo inflamação e estresse oxidativo. É importante ressaltar que esse ácido graxo é considerado um dos componentes mais importantes dos quais a atividade biológica da GR deriva. (Li et al., 2013; Kolayli et al., 2016; Honda et al., 2015; Chen et al., 2016; Miyata e Sakai, 2018).

Recentemente, a GR recebeu atenção especial devido a estudos que relatam sua ação antioxidante altamente eficiente e capacidade de eliminação de radicais livres. Alguns pesquisadores atribuíram as propriedades antioxidantes da GR à presença desse ácido 10-hidrovidecanóico (10-HDAA) que participa na eliminação de radicais hidroxila, bem como a cisteína, e de outros aminoácidos livres, incluindo prolina, que possuem ação no metabolismo da glutatona (Silici et al., 2009; Kocot et al., 2018). Os autores explicam que o efeito antioxidante da GR pode estar associado não apenas à eliminação de radicais livres, mas também a outro efeito indireto, baseado na inibição de enzimas que catalisam a peroxidação de lipídios endógenos, bem como à expressão gênica do citocromo P450, que é uma das fontes intracelulares de radicais H_2O_2 , O_2 e HO (Kocot et al., 2018).

Inoue et al. (2003) sugerem que o equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes determina o estresse oxidativo, logo consequências deste estresse incluem a modificação de proteínas celulares, lipídios e o ácido desoxirribonucleico (DNA). Assim, Watanabe et al. (2013) buscaram avaliar o efeito aplicação tópica da GR na mucosite oral induzida por 5-fluororacil (5-FU) associado a uma abrasão leve em hamsters. Filmes contendo 10% e 30% de GR foram anexados à mucosa oral, os resultados demonstraram que a GR foi capaz de eliminar os radicais livres, como radicais superóxidos, radicais hidroxila e radicais 1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), além de apresentar uma melhora significativa na recuperação do tecido, sugerindo que os efeitos foram causados pelas atividades anti-inflamatória e antioxidantes da GR.

Karadeniz et al. (2011) buscaram avaliar os efeitos da GR no combate ao estresse oxidativo causado pela cisplatina (CDDP) nos rins e fígado. Foram administradas doses de 300 mg/kg de GR dissolvidas em água, por via oral, durante 10 dias consecutivos, com objetivo de avaliar o efeito protetor da mesma nos danos oxidativos e de alterações apoptóticas nos rins e fígado de animais. Nas análises, observou-se que as concentrações séricas de Alanina Aminotransferase (ALT) em ratos que receberam CDDP e GR foram significativamente menores ($29,50 \pm 1,70$ IU/L) do que em ratos que receberam apenas CDDP ($80,50 \pm 2,50$ IU/L), bem como a redução da Alanina Aminotransferase (ALT) e dos níveis de creatinina. Também foi observado um aumento significativo no número de células apoptóticas e degenerativas no grupo CDDP, no entanto, o tratamento com GR impediu essas alterações histológicas em ambos os tecidos. Além disso, o tratamento com GR levou a um aumento da atividade antiapoptótica dos hepatócitos e do epitélio tubular, demonstrando que a apoptose induzida pela CDDP, pelo menos em parte, pode ser evitada através da administração da GR. Ainda, os autores também analisaram que os níveis de antioxidantes endógenos como a glutathiona reduzida (GSH), glutathiona - S-Transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) no grupo tratado com GR + CDDP, foram maiores do que no grupo CDDP, sugerindo que a GR tem um efeito de suporte no sistema antioxidante devido ao aumento na atividade destes compostos. Os autores comentaram que essas funções protetoras para o rim e o fígado podem ser devidas à atividade anti-apoptótica, antioxidante e de eliminação de radicais livres do GR e seus compostos.

Corroborando com o estudo anterior, Silici et al. (2009) administraram doses de 50 e 100 mg/kg de GR em ratos tratados com 7 mg/kg de cisplatina (CDDP), a fim de avaliar o efeito protetor da GR sobre parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo. Os pesquisadores observaram que a administração de GR em ratos tratados com CDDP promoveu um aumento nas atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e diminuição dos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido testicular. Alterações nos parâmetros bioquímicos foram parcialmente revertidas pelo tratamento com a GR, demonstrando que a GR poderia auxiliar na prevenção da toxicidade. Além disso, quando administrada após a cisplatina, a GR apresentou um possível efeito reparador contra a espermatotoxicidade causada pela cisplatina, demonstrando seu potencial antioxidante nesse tipo celular.

Segundo Çavusogl et al. (2009), o uso de certos antioxidantes, como selênio, vitaminas C e E podem ajudar a diminuir a toxicidade induzida por agentes químicos, tais como íons de metais pesados, e estes podem inibir mutagênese e carcinogênese. A GR foi capaz de agir na reversão da genotoxicidade e do estresse oxidativo induzido pelo cádmio em camundongos nas doses de 100 e 250mg/kg. Os resultados das análises deste estudo demonstraram um efeito protetor no número de micronúcleos e no estresse oxidativo, relacionado às doses de 100 e 250mg/kg que foram administradas. O efeito protetor da GR na toxicidade induzida pelo cádmio pode ser explicado pelas propriedades terapêuticas e capacidade antioxidante, no entanto, há poucos estudos que mostrem sua segurança e eficácia na prática clínica com outros fármacos e também em relação à dose adequada.

Galaly et al. (2014) investigaram os possíveis efeitos protetores da GR nas doses 50, 100 e 200 mg/kg contra anormalidades cromossômicas em células da medula óssea e alterações histológicas no tecido renal de camundongos, induzidas pelo ácido valpróico (VPA) na dose de 100mg/kg. Os pesquisadores observaram que a administração da GR combinada com o VPA apresentou diminuição das alterações histológicas nos tecidos renais, redução significativa de aberrações cromossômicas e uma elevação do índice mitótico. Além disso, foi observado que os grupos que receberam doses de 50 e 100 mg/kg de GR apresentaram efeitos melhores quando comparado ao grupo que recebeu a dose de 200 mg/kg.

Malekinejad et al. (2016) buscou avaliar o efeito cardioprotetor da GR em danos induzidos por paclitaxel em ratos, onde foi administrado doses de 50, 100 e 150 mg/kg de GR, por 28 dias. Foi observado que a geleia real nas três concentrações poderia reduzir os níveis de óxido nítrico no coração e diminuição do malondialdeído, ambos elevados pelo paclitaxel. A GR também protegeu contra lesão histopatológica induzida por paclitaxel, como edema difuso, hemorragia, congestão, exsudatos hialinos e necrose, e reduziu notavelmente os níveis dos biomarcadores cardíacos induzidos de creatina quinase (CK-BM) através da supressão do estresse oxidativo. Além disso, administração de geleia real de uma maneira dependente da dose resultou em um aumento significativo na capacidade antioxidante total. Entretanto, são escassos os relatos sobre os efeitos protetores da GR contra a toxicidade induzida por terapias moleculares.

Desta forma, alguns pesquisadores buscaram avaliar o efeito protetor da GR no pré-tratamento contra trombocitopenia, estresse oxidativo, bem como danos

na medula óssea, no baço e nos testículos induzida por Ciclofosfamida (CP) em ratos. Utilizou-se dosagens de GR (100 mg/kg), GR (200 mg/kg), GR (100 mg/kg) + CP e GR (200 mg/kg) + CP. A GR foi administrada por via oral por 14 dias. Em seguida, o CP nas concentrações de 100, 50 e 50 mg / kg foi injetada intraperitonealmente nos dias 15, 16, 17, respectivamente. Como resultados foram observadas alterações significativas onde a CP causou uma diminuição significativa no número de plaquetas, glóbulos brancos e vermelhos. Estas alterações prejudiciais foram significativamente revertidas no pré-tratamento de ratos com GR no GR 100 + CP e GR 200 + CP grupos ($P < 0,05$) (Khazaei et. al., 2020).

Além disso, a GR tem sido amplamente utilizada como alimento suplementar para promoção de saúde, embora ainda possua poucos estudos relacionados a sua administração em humanos. Apesar das propriedades antioxidantes da GR encontradas nos modelos *in vitro* e *in vivo*, existem poucos estudos em humanos que confirmam sua eficácia. Algumas pesquisas realizadas avaliaram sua influência nos parâmetros associados ao diabetes e ao estresse oxidativo. No ensaio clínico randomizado com 50 mulheres diabéticas do tipo 2 (DMT2), foi administrado 1000mg/dia de geleia real durante 8 semanas e avaliados parâmetros glicêmicos e de estresse oxidativo. Foi observado que o consumo de geleia real diminuiu a glicemia de jejum, hemoglobina glicada e MDA, sugerindo que a mesma é benéfica durante o DMT2 (Pourmoradian et al., 2014).

Em uma outra pesquisa realizada em humanos, os autores indicam que a GR apresenta um efeito genoprotetor contra a genotoxicidade induzida por doxorubicina (DXR), um potente composto quimioterápico genotóxico em linfócitos humanos e com mecanismo de proteção provavelmente mediado por atividades antienvhecimento, anti-apoptótica e antioxidante de GR (Jenketkan et.al., 2018). No entanto ainda são escassos os trabalhos que relatem as doses adequadas e sua ação no material genético.

1.2 GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNESE

Nas células vivas, o estresse oxidativo é processo resultante de um desequilíbrio fisiológico entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes do organismo. Isso pode afetar a integridade estrutural de macromoléculas, como proteínas, lipídios e o DNA, ocasionando, neste último caso,

genotoxicidade e mutagenicidade, que por sua vez, podem dar origem a condições fisiopatológicas complexas. Os estudos sobre genotoxicidade e/ou mutagenicidade buscam avaliar os processos que alteram a base genética da vida, podendo alterar a estrutura físico-química do DNA, processo esse classificado como mutagênese, quanto modificar o determinismo biológico em nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (Ślarczyńska et al. 2004; Basu e Nohmi, 2018; Khan et al. 2018). Todas as células do corpo estão constantemente expostas a danos ao DNA decorrentes de fatores endógenos, como o metabolismo celular, e fatores exógenos como agentes físicos ou químicos nocivos, como luz ultravioleta (UV), agentes mutagênicos, poluição, entre outros, resultando em lesões na estrutura do DNA. Essas lesões devem ser reparadas para evitar mutações genéticas, quebra cromossômica e bloqueio de replicação (Poehlmann e Roessner, 2010; Ciccia e Elledge, 2010). A falha em reparar o DNA ou o reparo do DNA propenso a erros contribui para a carcinogênese, através da indução de instabilidade genômica e de aberrações genéticas que causam o câncer e o envelhecimento (Weeden, e Asselin-Labat, 2018).

De acordo com Erdtmann, (2003), o DNA é o principal portador da informação genética das células dos organismos, enquanto o RNA (ácido ribonucleico) transfere tais informações para que ocorra a síntese de proteínas a partir de aminoácidos. Desta forma, preservar a informação da sequência genômica nos organismos vivos é importante para a perpetuação da vida (Traubee e Carel, 2017). Uma alteração na molécula de DNA pode acarretar mudanças nos aminoácidos, transformando a estrutura da proteína pré-determinada pelo material genético, deixando-a menos eficaz ou totalmente ineficaz (Chatterjee e Walker, 2017).

Alterações mutagênicas que ocorrem nas células germinativas podem ser passadas para as gerações futuras, enquanto as mutações somáticas contribuem para a patogênese de várias condições fisiopatológicas, incluindo o câncer. Dessa forma, o termo "mutagênico" refere-se ao agente químico, físico ou biológico que é capaz de induzir uma mutação, ou seja, um dano na molécula de DNA que não é reparado no momento da replicação celular (Ślarczyńska et al., 2004). Bossa et al. (2018) referem a mutagenicidade à indução de lesões transmissíveis permanentes, alterações na quantidade ou estrutura do material genético em células ou organismos. Estes incluem diferentes tipos de eventos, como substituições e deleções de bases, aberrações cromossômicas estruturais (quebra e rearranjos, ou seja,

clastogenicidade), e numéricos (perda ou ganho de cromossomas, isto é, aneuploidia).

Já se tem relatos, hoje em dia, de compostos bioativos e químicos que reduzem ou previnem as mutações, sendo chamados de agentes antimutagênicos ou antígenotóxicos (De Flora, 1998; Słoczyńska et al., 2004). De Flora (1998), apresentou como sugestão uma classificação dos inibidores de mutagênese e carcinogênese em três níveis de prevenção, considerando o modo de ação dos mesmos, assim como o ambiente de ação, extra ou intracelular. Dentre os mecanismos extracelulares temos a inibição da penetração ou remoção do agente do organismo; formação de complexo inativo, inibição da formação endógena de mutágenos; diluição ou desativação do mutágeno e carcinógeno; e ainda o favorecimento da absorção de agentes protetores. Quando se fala em mecanismos de inibição de mutação e iniciação do câncer por mecanismos celulares, temos: desintoxicação celular, modulação do metabolismo celular, modificação do transporte trans-membrana, inibição da replicação celular, controle da expressão gênica e ainda modulação no sistema de reparo do DNA. A prevenção primária inibe a mutação e a iniciação do câncer, tanto pelo ambiente externo quanto interno da célula, é principalmente coincidente com uma classificação de agentes quimiopreventivos. A prevenção secundária considera os vários mecanismos que inibem a progressão do tumor à condição de malignidade, prevenção de múltiplos tumores primários. A prevenção terciária refere-se à inibição das metástases que é inversamente fora do limite de quimioprevenção.

Os agentes alquilantes mais comuns usados regularmente em laboratórios a fim de avaliar a ação de algum composto como antígenotóxico e/ou antimutagênico são o metil metanossulfonato (MMS), etil metanossulfonato (EMS), N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) e metilnitrosourea (MNU) estes reagem com DNA, gerando lesões mutagênicas e carcinogênicas (Chatterjee e Walker, 2017). O metil metanosulfonato (MMS) é um agente alquilante de DNA, que tem sido usado por muitos anos como um agente danificador do DNA para induzir mutagênese de ação direta, uma vez que este composto metila regiões nucleofílicas do DNA. O MMS modifica tanto a guanina (para 7-metilguanina) como a adenina (para 3-metilguanina), causando erros de base e bloqueio de replicação, respectivamente. Danos no DNA causados por agentes alquilantes são predominantemente reparados pelo reparo de excisão de base (BER) (Lundin et al, 2005). Dessa forma, alguns alimentos podem

ser avaliados quanto a sua antigenotoxicidade e antimutagenicidade utilizando alguns desses agentes.

Assim, observa-se que os agentes antimutagênicos são capazes de minimizar os efeitos mutagênicos. Portanto, o conhecimento sobre o modo de ação de certos compostos mutagênicos fornece uma base para uma explicação de como os compostos antimutagênicos funcionam. A identificação dos compostos antimutagênicos está entre as áreas mais promissoras de pesquisa nos últimos anos (Słoczyńska et al., 2004). Estudos recentes mostram que a geleia real apresenta alto potencial antioxidante, no entanto, pouco se sabe em relação a genotoxicidade e antigenotoxicidade da mesma. Diante disso se torna importante avaliar estes parâmetros pois o consumo deste alimento vem crescendo nos últimos anos. Além disso torna-se importante determinar a capacidade da geleia real em modular a ação do metil metanosulfonato (MMS) (um agente sabidamente genotóxico) *in vivo* em células de camundongos. Assim sendo, neste trabalho, foi avaliada a capacidade antigenotóxica e antimutagênica da GR em diferentes concentrações, assim como sua genotoxicidade e a mutagenicidade, uma vez que ainda são escassos os trabalhos que tragam a melhor dose e eficácia para estes efeitos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vivo* o efeito da geleia real sobre a genotoxicidade e mutagenicidade induzida pelo agente alquilante metil metanosulfonato (MMS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Investigar a capacidade antigenotóxica da geleia real, em diferentes concentrações, utilizando o Ensaio Cometa em sangue periférico;
- 2- Avaliar a mutagenicidade da geleia real, em diferentes concentrações, através do Teste de Micronúcleos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº 11.794/2008.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, segundo protocolo 070/2018-2 (Anexo A). Foram utilizados 66 camundongos Swiss de 60 dias de idade. Os animais foram obtidos do centro de experimentação animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram alojados em caixas de polietileno, com comida e água ad libitum e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro (07:00 às 19:00) (Claro 7:00h), com temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Com base em estudos prévios em modelos animais de administração de MMS, o número de animais foi previsto para 6 camundongos Swiss machos de 60 dias de idade a fim de se obter o número amostral total de 66 animais (Fagundes et al., 2017). Para uma diferença de até 20% nos parâmetros analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 6 animais para cada grupo da prole, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O desenho experimental foi dividido em duas etapas e para isso tivemos grupos experimentais diferentes:

Etapa 1: foi avaliado a genotoxicidade da geleia real e para isso foram utilizados 5 grupos, conforme descrito abaixo:

- Grupo 1 – Água: administração de água, por gavagem no volume de 0,1mL/10g de peso corporal nos tempos 0h e 24h;

- Grupo 2 – Geleia real 150mg: administração de geleia por gavagem, na dose 150mg/kg nos tempos 0h e 24h;
- Grupo 3 – Geleia real 300mg: administração de geleia real por gavagem na dose de 300 mg/kg nos tempos 0h e 24h.
- Grupo 4 - Geleia real 1000mg: administração de geleia por gavagem, na dose 1000 mg/kg nos tempos 0h e 24h.
- Grupo 5 – MMS: Administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 0h.

Etapa 2: Foi avaliado a antigenotoxicidade da geleia real e foram utilizados 6 grupos, conforme descrito:

- Grupo 6 - geleia real 150mg + MMS (pré-tratamento): administração por gavagem de geleia real na dose 150 mg/kg de peso corporal no tempo 0h e administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 24h.
- Grupo 7- geleia real 300mg + MMS (pré-tratamento): administração por gavagem de geleia real na dose de 300 mg/kg no tempo 0h e administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 24h.
- Grupo 8- geleia real 1000mg + MMS (pré-tratamento): administração por gavagem de geleia real na dose de 1000 mg/kg no tempo 0h e administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 24h.
- Grupo 9 – MMS + geleia real 150mg (pós-tratamento): administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 0h e administração de geleia real na dose 150 mg/kg no tempo de 24h.
- Grupo 10 – MMS + geleia real 300mg (pós-tratamento): administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 0h e administração de geleia real na dose de 300mg/kg de peso corporal no tempo de 24h.
- Grupo 11 – MMS + geleia real 1000mg (pós-tratamento): administração intraperitoneal de MMS na dose de 40mg/kg de peso corporal no tempo 0h e administração de geleia real na dose de 1000mg/kg de peso corporal no tempo de 24h.

O experimento foi realizado através da administração da geleia real liofilizada (150mg/kg; 300mg/kg e 1000mg/kg) ou água por meio de gavagem e do agente alquilante MMS (40mg/kg) por via intraperitoneal. Estas dosagens foram

escolhidas de acordo com dados descritos previamente na literatura (Pourmoradian et al., 2014; Mohamed et al., 2015; Malekinejad et al., 2016). A via de administração e o período de tratamento foram escolhidos de acordo com trabalhos já publicados na literatura, uma vez que a diluição da geleia real foi realizada em água para atingir as doses definidas (Mohamed et. al., 2015; Fagundes et. al., 2017).

O desenho experimental com os grupos experimentais está ilustrado na tabela 1 e 2 abaixo:

Tabela 1. Desenho experimental de avaliação de genotoxicidade: Tempo de administração das diferentes doses de geleia real, coleta de sangue e eutanásia dos animais.

Procedimentos	Tempo de exposição/administração		
	0 h	24 h	48 h
Controle	Tratamentos:		
	1. 1ª administração de água	1ª coleta de sangue 2ª Administração de água	2ª coleta de sangue Eutanásia
	2. 1ª administração de geleia real 150mg/kg	1ª coleta de sangue 2ª administração de geleia real (GR)150mg/kg	2ª coleta de sangue Eutanásia
	3. 1ª administração de geleia real 300mg/kg	1ª coleta de sangue 2ª administração de geleia real (GR)300mg/kg	2ª coleta de sangue Eutanásia
	4. 1ª administração de geleia real (GR)1000mg/kg	1ª coleta de sangue 2ª administração de geleia real (GR)1000mg/kg	2ª coleta de sangue Eutanásia
Agente alquilante	5. Metil metano sulfonato (MMS) Única administração intraperitoneal (IP)	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue Eutanásia

Tabela 2. Desenho experimental de antigenotoxicidade: Tempo de administração das diferentes doses de geleia real, coleta de sangue e eutanásia dos animais.

Procedimentos	Tempo de exposição/administração		
	0 h	24 h	48 h
Pré-tratamento	6. Geleia real 150mg/kg	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue
	Única administração	Única administração de MMS	Eutanásia
	7. Geleia real 300mg/kg	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue
	Única administração	Única administração de MMS	Eutanásia
	8. Geleia real 1000mg/kg	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue
	Única administração	Única administração de MMS	Eutanásia
Pós-tratamento	9. MMS	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue
	Única administração IP	Única administração de Geleia real 150mg/kg	Eutanásia
	10. MMS	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue
	Única administração IP	Única administração de Geleia real 300mg/kg	Eutanásia
	11. MMS	1ª coleta de sangue	2ª coleta de sangue
	Única administração IP	Única administração de Geleia real 1000mg/kg	Eutanásia

N: 6 animais por grupo

3.3 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Após os tratamentos foram coletadas amostras de sangue de todos os animais através de incisão na extremidade da cauda, retirando-se sangue da veia

caudal com auxílio de uma micropipeta (10 μ L) para a realização do Ensaio Cometa nos tempos 24h e 48h.

Posteriormente a cada coleta de sangue a fim de evitar sangramento e dor, foi aplicado spray antisséptico e analgésico na cauda dos animais após o corte. Após a última coleta os animais foram eutanasiados e retirada a medula óssea para o Teste de Micronúcleos.

3.3.1 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados. As células do sangue (alíquotas de 5 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 μ L ou 75 μ L, respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado Syber Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise.

Para avaliação dos danos, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x utilizando o programa Comet Assay IV, onde foram avaliadas 100 células/animal. As células foram classificadas de forma automática quanto às proporções do tail length (consiste na distância do meio do núcleo até o final da cauda em μ m) e tail moment (tail length x intensidade da fluorescência da cauda), através do Tail Intensity (%).

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas serão codificadas para análise às cegas.

3.3.2 TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000).

Após a extração da medula óssea, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas.

Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs e ENCs para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

3.3.3 PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE DANOS (DR%)

O percentual de danos do MMS foi calculado da seguinte forma:

- Média do grupo MMS - a média de um grupo associado (pré ou pós-tratamento) e MMS- média do grupo controle.

Os resultados foram multiplicados por 100 para obter a porcentagem de danos. Este procedimento foi realizado para avaliar a porcentagem de danos no ensaio cometa de acordo com Mauro et al. (2013).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média (média \pm DP). As variáveis foram analisadas quanto à normalidade da distribuição utilizando o teste de Bartlett's. Para amostras não paramétricas foram utilizadas Kruskal-Wallis seguido do *post hoc* de Dunn's e para amostras paramétricas foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de *post hoc* de Tukey.

O teste t-Student foi utilizado para se fazer a comparação dos parâmetros com distribuição normal em relação às comparações de pré e pós-tratamento. No caso de dados não paramétricos foi utilizado o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para verificar a possível associação entre a dose de suplementação com geleia real e os danos ao DNA, realizou-se o teste de correlação de Pearson. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. O pacote estatístico utilizado foi o Graph Pad Prism versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DA GELEIA REAL ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Após a realização dos testes descritos anteriormente foram analisados os danos causados no DNA de células sanguíneas de camundongos expostos ao agente mutagênico MMS, geleia real (150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg) e água. Foram avaliadas células de sangue periférico total, através do ensaio cometa, pelo parâmetro Tail Intensity (%). A figura 1, mostra os resultados em 24 e 48hs, do tratamento com água, com as diferentes doses de GR e com o agente mutagênico no Ensaio Cometa.

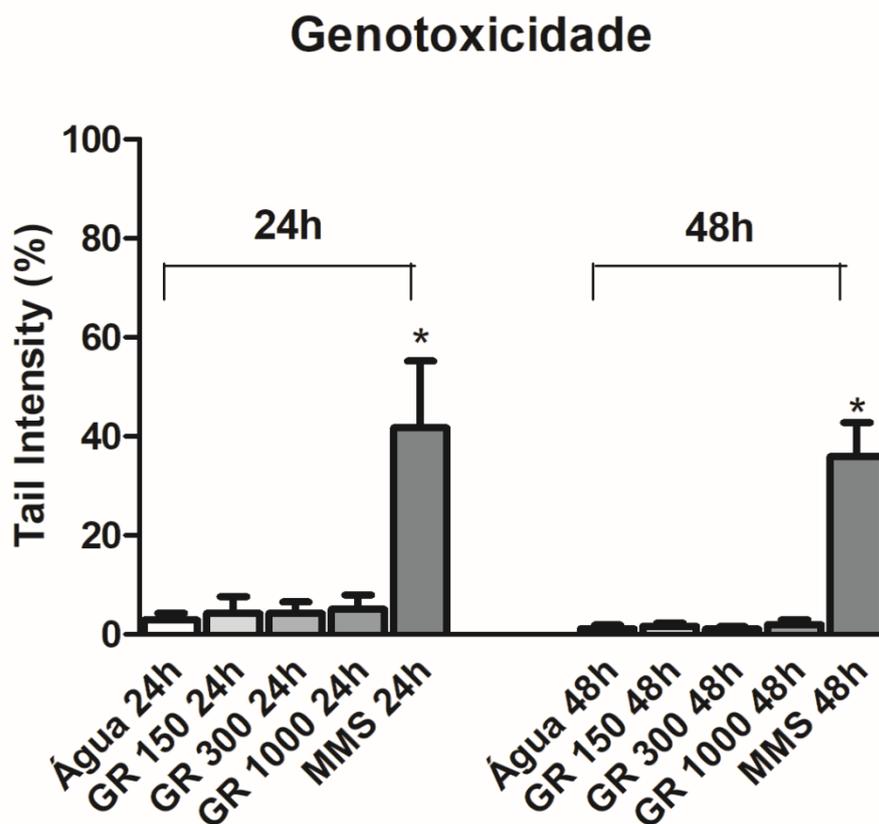


Figura 1. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico, induzidos por água, geleia real (150mg/kg; 300mg/kg e 1000mg/kg) e pelo agente alquilante metil metanosulfonato (MMS). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=6 animais por grupo). *Valores estatisticamente significativos em relação a todos os grupos tratados (p<0,05, ANOVA, post hoc Tukey).

Ao avaliar o Tail Intensity, nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu água e os grupos que receberam as doses de GR (150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg), em 24h e 48h. No entanto, em relação ao grupo que recebeu o MMS, ocorreu um aumento significativo de danos ao DNA em relação aos demais grupos tratados ($p < 0,05$) em 24h e 48h (Figura 1). Demonstrando que a geleia real independente da dose não possui ação genotóxica em relação ao MMS.

5.2 ANÁLISES DA ANTIGENOTOXICIDADE DA GELEIA REAL ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Para verificar ação antigenotóxica da geleia real, foram administradas nos camundongos doses de 150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg como pré-tratamento e pós-tratamento ao agente alquilante MMS, comparados respectivamente em 24h e 48h e analisados os danos em sangue total periférico (Figura 2).

Na figura 2A, foi observado uma diferença estatisticamente significativa no dano ao DNA em células sanguíneas no grupo que recebeu geleia real de 150mg/kg como pré-tratamento ao agente alquilante MMS, com uma redução de 42% dos danos causados pelo agente mutagênico ($p < 0,05$). Quando a mesma dose foi administrada como pós-tratamento ao agente alquilante, ocorreu também uma diferença estatisticamente significativa, mas com redução de 84% ($p < 0,05$) dos danos causados ao DNA.

Já nos grupos tratados com 300mg/kg de GR (figura 2B), no pré-tratamento ocorreu a redução de 52% dos danos causados pelo MMS, porém esta redução não apresentou diferença estatisticamente significativa, apresentando apenas uma tendência na diminuição dos mesmos ($p > 0,05$). No pós-tratamento houve uma diferença estatisticamente significativa, com uma redução de 74% ($p < 0,05$) dos danos causados pelo MMS.

Em relação ao grupo que recebeu o pré-tratamento com GR na dose de 1000mg/kg (Figura 2C), foi observado uma redução de apenas 31% dos danos causados pelo MMS, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Já, no pós-tratamento foram encontradas diferenças estatisticamente

significativas em relação a redução dos danos, demonstrando uma redução de 93% ($p < 0,05$) dos danos causados pelo MMS (Figura 2C).

MMS Pré e Pós-Tratamento

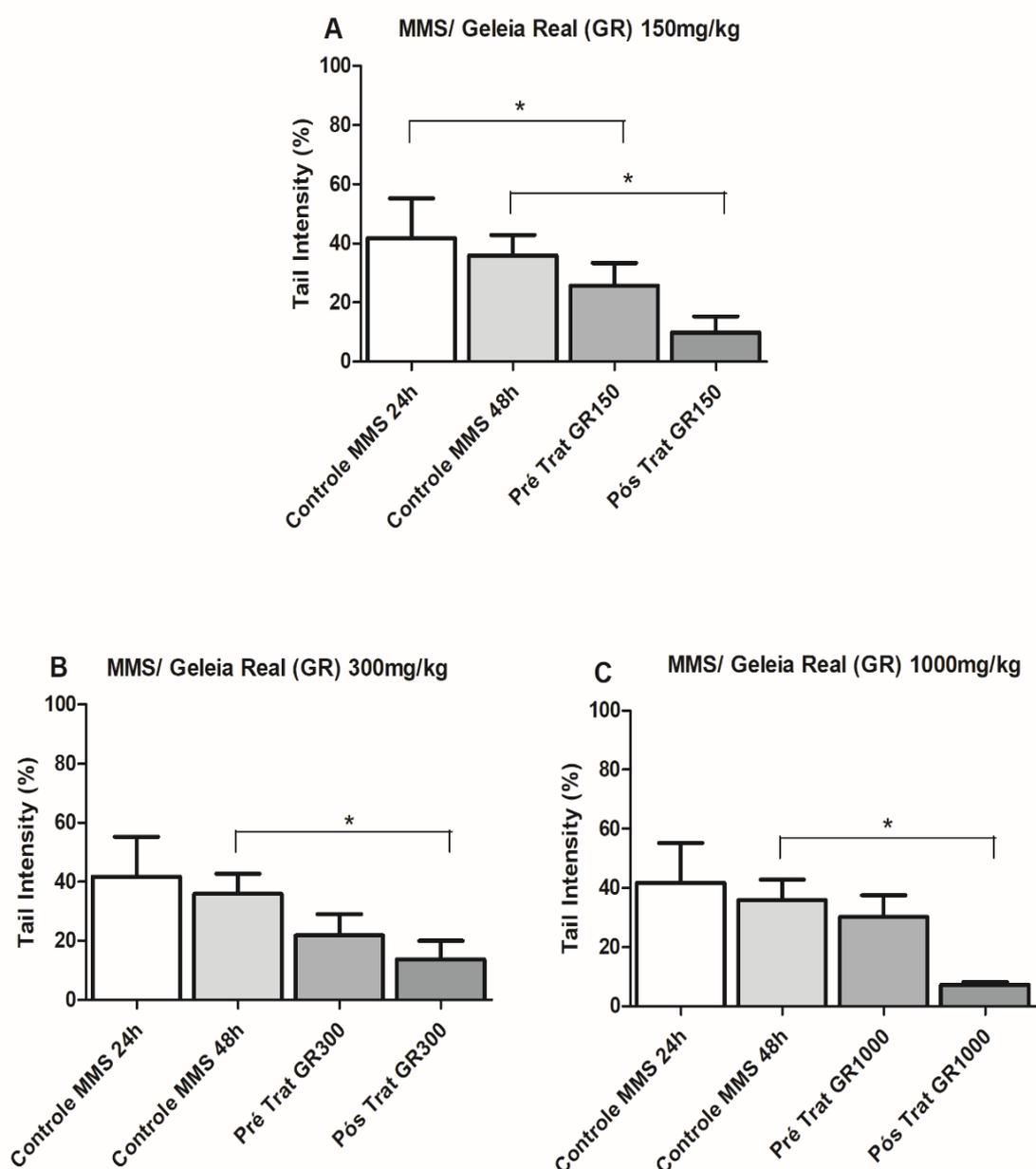


Figura 2. Danos em DNA avaliados através do parâmetro Tail Intensity (%) no Ensaio Cometa em sangue total periférico de camundongos tratados com metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratados com geleia real (GR). A: 150mg/kg; B: 300mg/kg; C: 1000mg/kg. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=6$ animais por grupo). *Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test).

Com o intuito de verificar se existia uma correlação entre o dano ao DNA causado pelo MMS (0mg/kg de GR) e as três doses de GR (150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg) no pré e/ou pós-tratamento, foi aplicado o teste de correlação de Pearson com regressão linear (Figura 3).

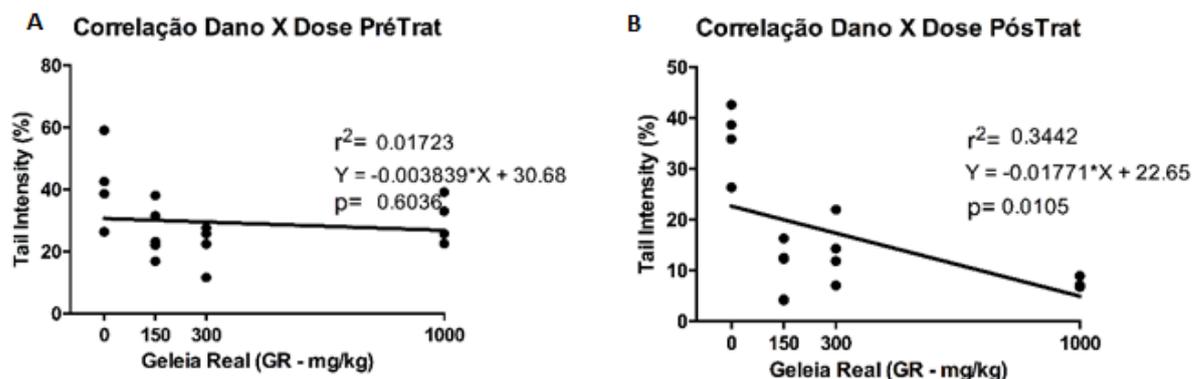


Figura 3. Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre os danos no DNA do metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratamento com geleia real (m/kg) medidos pelo parâmetro de Tail Intensity (%) (n=6 animais por grupo).

No primeiro gráfico (Figura 3A) é possível observar que não houve correlação entre as doses no pré-tratamento e o dano no DNA. Já no pós-tratamento (Figura 3 B) houve uma correlação negativa, onde a melhor dose foi a de 1000mg/kg, pois a medida que a dose aumentava diminuía o dano no DNA ($p < 0,05$).

5.3 MUTAGENICIDADE DA GELEIA REAL

O teste de micronúcleos avaliou se o consumo de GR promove efeitos mutagênicos nos camundongos. A tabela 3 apresenta os resultados deste ensaio nos grupos controle, água, MMS 40mg/kg, GR (150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg).

Tabela 3. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos suplementados com Geleia Real em diferentes doses e administração de Metil metanosulfonato (MMS) via intraperitoneal.

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
Água	0,33 ± 0,51	0,55 ± 0,01
MMS 40mg/kg	9,00 ± 4,0*	0,54 ± 0,04
GR 150 mg/kg	0,50 ± 0,83#	0,54 ± 0,01
GR 300 mg/kg	0,33 ± 0,51#	0,55 ± 0,03
GR 1000 mg/kg	0,50 ± 0,82#	0,53 ± 0,03

Foram analisadas 1000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n=6 animais por grupo). * Diferença significativa em relação ao grupo água, $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). # Diferença significativa em relação ao grupo MMS, $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Observa-se no teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos que, os animais que receberam apenas o MMS tiveram aumentos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) no número de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao grupo água e às demais doses de GR ($p < 0,05$) (tabela 3).

Em relação a proporção de EPC/ENC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade (Tabela 3).

5.4 ANTIMUTAGENICIDADE DA GELEIA REAL

O teste de micronúcleos avaliou se a suplementação com GR nas diferentes doses utilizadas neste experimento foi capaz de proteger dos efeitos mutagênicos induzidos pelo agente alquilante MMS. A tabela 4, apresenta os resultados do pré-tratamento encontrados neste teste.

Tabela 4. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos que receberam pré-tratamento com Geleia Real em diferentes doses e administração de Metil metanosulfonato (MMS) via intraperitoneal.

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
MMS 40mg/kg	9,00 ± 4,0	0,54 ± 0,04
GR 150 mg/kg + MMS 40mg/kg	2,16 ± 1,94*	0,54 ± 0,01
GR 300 mg/kg + MMS 40mg/kg	4,50 ± 2,25*	0,56 ± 0,02
GR 1000 mg/kg + MMS 40mg/kg	4,00 ± 1,72*	0,54 ± 0,02

Foram analisadas 1000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n=6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo MMS, $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Observa-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos que receberam GR como pré-tratamento ao MMS, observando uma diminuição do número de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação as doses de 150, 300 e 1000mg/kg (tabela 4).

A tabela 5 demonstra os resultados da GR nas diferentes doses no pós-tratamento à administração de MMS. Observa-se que ocorreu uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo MMS, uma vez que houve uma diminuição do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (tabela 5).

Tabela 5. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos que receberam pós-tratamento com Geleia Real em diferentes doses e administração de Metil metanosulfonato (MMS) via intraperitoneal.

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
MMS 40mg/kg	9,00 ± 4,0	0,54 ± 0,04
MMS 40mg/kg + GR 150 mg/kg	1,16 ± 1,94*	0,54 ± 0,01
MMS 40mg/kg + GR 300 mg/kg	1,16 ± 2,25*	0,56 ± 0,02
MMS 40mg/kg + GR 1000 mg/kg	0,83 ± 1,72*	0,55 ± 0,02

Foram analisadas 1000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n=6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo MMS, $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

Por fim, foram aplicados testes para analisar uma possível associação entre o número de MN em EPC nos animais tratados com MMS e pré ou pós-tratados com GR nas doses de 150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg.

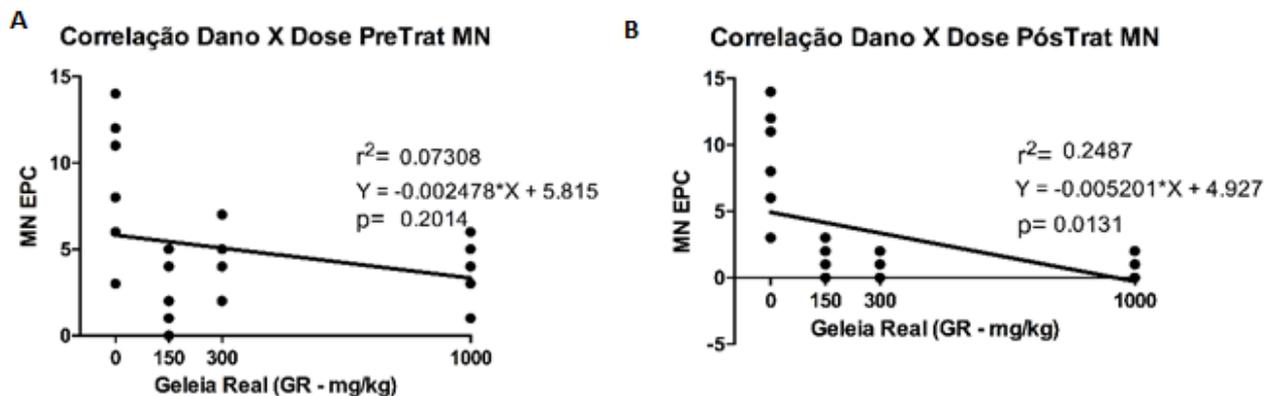


Figura 4. Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o número de micronúcleos em EPC (eritrócitos policromáticos) do metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratamento com geleia real (m/kg) medidos pelo (%) (n=6 animais)

Desta forma, os testes representados pela figura 4, mostram que, de acordo com o primeiro gráfico (Figura 4 A) não houve diferença significativa no pré-tratamento com GR e a formação de micronúcleos pelo MMS. Já na Figura 4B, houve uma correlação negativa no pós-tratamento com GR em relação aos danos causados pelo MMS uma vez que quanto maior a dose de GR (1000mg/kg), menor o número de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos ($p < 0,05$).

Estes dados corroboram com os dados encontrados no teste cometa, demonstrando que a GR no pós-tratamento apresenta melhores resultados de diminuição de danos no DNA, pois quanto maior a dose, menor foi o dano observado.

6. DISCUSSÃO

De acordo com Kocot et al. (2018), os produtos produzidos pelas abelhas de modo geral apresentam grandes quantidades de antioxidantes que são capazes de combater os efeitos causados pelo estresse oxidativo na patogênese de muitas doenças, em especial a GR. Ainda segundo Alu'datt et al. (2018), a GR apresenta nutrientes e compostos bioativos com grande potencial de ação em atividades biológicas e farmacêuticas, sendo as proteínas, peptídeos, lipídios, compostos fenólicos e flavanóides os principais compostos bioativos responsáveis pelas funções terapêuticas da GR.

A geleia real vem sendo pesquisada em virtude do seu papel fundamental na colmeia, uma vez que este “superalimento” é essencial para o desenvolvimento larval e para a reprodução de rainhas em colônias de abelhas através do metabolismo de açúcares, lipídeos e proteínas (Fratini et al., 2016; Ahmad et al., 2020).

A GR é uma substância rica em nutrientes, devido às propriedades biológicas excepcionais, vem sendo utilizada nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos. Vários estudos atestam que a GR possui propriedades antienvhecimento, antibacteriana, anti-fadiga, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antidiabético e antimutagênica, atribuídas principalmente aos componentes bioativos que ela apresenta (Ramanathan, et al., 2018). Além disso, Ramadan e Al-Ghamdi, (2012) e Khazaei et al. (2017) também descreveram suas diferentes propriedades medicinais relacionadas ao aumento da atividade imune e melhora na infertilidade.

A atividade antioxidante e a potência contra radicais livres foram relatadas em vários estudos. A ação antioxidante está relacionada ao ácido graxo 10-hidroxi-2-decenóico- (HDEA), composto identificado somente na composição da geleia real, não sendo encontrado em nenhum outro produto melífero (Silici et al. 2009-2011; Kocot et al, 2018). Pesquisas sugerem que a combinação de agentes antioxidantes com medicamentos sabidamente genotóxicos pode ser uma forma de abordagem para diminuir os efeitos colaterais dos mesmos (Khazaei et al., 2020). Neste cenário, estudos recentes sobre a GR, vêm despertando um grande interesse da comunidade científica nos últimos anos, uma vez que evidências científicas têm demonstrado que a GR é um recurso potencialmente valioso, com propriedades potenciais de saúde para seres humanos.

No presente trabalho, camundongos Swiss machos foram suplementados com geleia real liofilizada nas doses de 150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg afim de avaliar a capacidade antigenotóxica/antimutagênica da geleia real, em diferentes doses, frente a um agente alquilante sabidamente mutagênico como o metil metanosulfonato (MMS).

Para avaliar a capacidade genotóxica/ antigenotóxica das diferentes doses de geleia real testadas neste estudo utilizamos o ensaio cometa em sangue periférico de camundongos. Esta técnica é amplamente utilizada para a detecção de efeitos genotóxicos/antigenotóxicos de substâncias naturais, e comumente encontrado na literatura. A técnica do ensaio cometa alcalino ($\text{pH} > 13$) que utilizamos, é flexível e pode ser usada para avaliar vários tipos de danos no DNA, como para detectar quebras de fita simples e dupla, sítio álcali-lábeis e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína (Liao et al., 2009).

Nos experimentos executados neste estudo para a análise da genotoxicidade pelo ensaio cometa, a geleia real causou baixos índices de danos nas células sanguíneas dos animais tratados. Os valores foram semelhantes ao grupo controle negativo e bem abaixo dos valores encontrados no grupo controle positivo. Esses resultados demonstram que a geleia real, administrada nas doses de 150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg, não exerce atividade genotóxica.

Resultados semelhantes foram citados por Çavusogl et al. (2009), que ao avaliar papel protetor da geleia real na genotoxicidade e estresse oxidativo induzido por cádmio em camundongos, mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas (100 e 250mg/kg) foi genotóxica quando avaliadas através do teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos e células esfoliadas da mucosa bucal, bem como no teste de aberrações cromossômicas (CA) em medula óssea de roedores.

A GR indica um efeito protetor contra a genotoxicidade induzida por doxorubicina (DOX) em linfócitos humanos e um mecanismo de proteção provavelmente mediado por atividades antienvhecimento, anti-apoptótica e antioxidante de GR (Jenkhetkan et al., 2018).

Para avaliação do potencial antigenotóxico da GR nas respectivas doses testadas neste estudo, foi utilizado um agente alquilante, o MMS. O Metil Metanosulfonato (MMS) é um agente mutagênico de ação direta que metila regiões nucleofílicas do DNA. A genotoxicidade deste agente é medida por modificações de base, estas enfraquecem as ligações N-glicosídicas, resultando na depuração/

depirimidinação das fitas de DNA, favorecendo de tal forma o surgimento de sítios álcali-lábeis (sítios AP). A remoção destes sítios AP pelas AP endonucleases cliva o DNA adjacente a esses sítios, gerando conseqüentemente quebras nas moléculas de DNA (Lundin et al., 2005; Boiteux e Guillet, 2004).

Nos experimentos executados neste estudo para as avaliações de antigenotoxicidade, os resultados demonstraram uma redução nos parâmetros de Tail Intensity (%) induzidos pelo MMS em todas as doses de GR. No que se refere ao pré-tratamento com GR de 150mg/kg, observou-se uma redução estatisticamente significativa de 42% dos danos ao DNA causados pelo MMS. Os outros grupos apresentaram reduções de 52% no grupo 300mg/kg e 31% no grupo 1000mg/kg, porém sem significância estatística.

Quando avaliamos a capacidade de modulação dos danos no pós-tratamento com a GR nas doses de 150mg/kg, 300mg/kg e 1000mg/kg foi observado uma maior redução de danos quando comparado ao pré-tratamento. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação a redução dos danos que chegaram a reduções de até 93% na dose de 1000mg/kg em relação aos danos causados pelo MMS.

Alguns autores já demonstraram a capacidade de redução do dano em DNA da GR. Silici et al. (2009) administraram doses de 50 e 100 mg/kg de GR em ratos tratados com 7 mg/kg de cisplatina (CDDP) a fim de avaliar o efeito protetor da GR sobre parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo. Os pesquisadores observaram que a administração de GR em ratos tratados com CDDP promoveu um aumento nas atividades da SOD, CAT e GPx e diminuição dos níveis de MDA no tecido testicular. Os resultados também demonstraram que a CDDP levou a alterações histológicas significativas que foram diminuídas pela GR.

Os resultados acima citados apontam para a ação da GR aumentando enzimas antioxidantes, tanto em condições fisiológicas normais, quanto frente ao estresse oxidativo causado por agentes alquilantes. De acordo com os dados apresentados por Silici et al. (2009), o aumento da atividade enzimática se torna maior à medida que a dose de GR aumenta.

Dados da literatura de fato afirmam o efeito antioxidante da GR. Segundo Çavusoglu et al. (2009) por exemplo, a GR pode reverter a genotoxicidade e o estresse oxidativo induzido por cádmio em camundongos, o que melhora o status antioxidante via glutathiona (GSH) e reduz a produção de malondialdeído (MDA). Resultados

semelhantes foram encontrados por Karadeniz et al. (2011), onde ratos expostos à cisplatina e tetracloreto de carbono e à administração de uma dose oral única de GR (300 mg/kg) por 15 dias consecutivos pode diminuir os danos do estresse oxidativo no fígado e no tecido renal avaliados através da diminuição da produção de MDA e do aumento da concentração de enzimas antioxidantes celulares, como SOD, CAT, GR e GPx. Também os níveis séricos de creatinina em ratos que receberam a administração de GR antes do tratamento com CDDP foram significativamente menores ($p < 0,05$) do que aqueles nos animais que receberam a cisplatina isoladamente ($3,15 \pm 0,50$ mg/dl). Recentemente, foi demonstrado que a GR pode atuar revertendo a genotoxicidade e a nefrotoxicidade da toxicidade hepática induzidas por tetracloreto de carbono, cádmio e paracetamol, respectivamente (Cemek et al., 2010; Çavusogl et al. 2009; Kanbur et al., 2009)

Alguns compostos, conhecidos como antimutagênicos, são capazes de diminuir ou mesmo remover os efeitos mutagênicos de produtos químicos potencialmente perigosos. Dois processos principais classificam os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos: desmutagênese e bio-antimutagênese. A Desmutagênese são agentes protetores capazes de inativar agentes mutagênicos antes que eles atinjam o DNA. Por outro lado, na bio-antimutagênese ocorre a atuação dos antimutagênicos sobre o processo que leva à indução de danos. Esses compostos são capazes de influenciar no reparo de lesões causadas no DNA. De acordo com o mecanismo de ação dos antimutagênicos, várias classes de compostos podem ser distinguidas, como atividade antioxidante, compostos que inibem a ativação de mutagênicos, e compostos caracterizados com vários modos de ação (Kada et al., 1982; De Flora, 1998).

Independente do sistema-teste, agentes antimutagênicos usados no pré-tratamento podem atuar como desmutagênicos, e sugere-se que no pós-tratamento estes agentes antimutagênicos atuem pelo mecanismo de bio-antimutagênese, estando este relacionado ao processo de reparo (Kada et al., 1982). Nossa hipótese é de que a GR utilizada no pré-tratamento possa ter atuado capturando os agentes alquilantes ou mesmo, tê-los inativados, ocorrendo o processo de desmutagênese. Outra hipótese é de que a GR, utilizada no pós-tratamento, possa ter induzido algumas enzimas, as quais atuaram como inativadoras metabólicas dos processos mutagênicos, tendo ocorrido a diminuição dos danos pelo mecanismo de bio-antimutagênese, reparando os danos que ocorreram no DNA.

Um outro teste utilizado neste trabalho para análise de instabilidade genômica, o teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos, que providencia uma estimativa da quantidade de mutações cromossômicas induzidas através de eventos de clastogênese e aneugênese (Krishna e Hayashi, 2000). Da mesma forma que no ensaio cometa, analisando resultados sobre a formação de micronúcleos em medula óssea de camundongos, os animais que receberam apenas o MMS tiveram aumentos estatisticamente significativos no número de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao grupo que recebeu apenas água. Em relação a proporção de EPC/ENC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade. Isso se justifica, pois, o MMS é um agente alquilante do DNA, que tem sido usado por muitos anos como um agente danificador do mesmo, induzindo danos de maneira direta, uma vez que este composto metila regiões nucleofílicas do DNA (Lundin et al., 2005).

Quando avaliamos a ação o agente mutagênico e a GR no no pré-tratamento não houve diferença significativa na formação de micronúcleos pelo MMS, já no pós-tratamento com GR em relação aos danos causados pelo MMS, observamos uma redução de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) nos grupos suplementados com GR, mostrando que a GR atua como protetora celular, uma vez que auxiliou na proteção contra os danos ocasionados pelo MMS. Estes achados estão de acordo com os de Galaly et al. (2014) que investigaram os possíveis efeitos protetores da GR nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg contra anormalidades cromossômicas em células da medula óssea e alterações histológicas no tecido renal de camundongos induzidas pelo ácido valpróico (VPA). Os pesquisadores observaram que a administração da GR combinada com o VPA levou a diminuição das alterações histológicas nos tecidos renais, redução significativa de aberrações cromossômicas e uma elevação do índice mitótico.

Em relação a suplementação com GR nas diferentes doses utilizadas neste experimento pode-se observar que a mesma foi capaz de proteger o material genético dos efeitos mutagênicos induzidos pelo agente alquilante MMS. No entanto, nossos resultados mostraram que não houve uma associação positiva e significativa entre as doses de GR no pré-tratamento com o número de células micronucleadas. Já no pós-tratamento, foi possível observar uma correlação significativa mostrando que conforme a dose de GR aumentava, menor era o número de micronúcleos nos

eritrócitos policromáticos. Estes dados corroboram com os dados encontrados no teste cometa, demonstrando que a GR no pós-tratamento foi mais efetiva na reparação e diminuição dos danos em DNA.

Achados semelhantes foram descritos por Pourmoradian et al. (2014), onde a administração de 1000mg/dia de geleia real durante 8 semanas em mulheres diabéticas do tipo 2 (DMT2) levou a uma diminuição da glicemia de jejum, hemoglobina glicada e formação de MDA, sugerindo que a mesma é benéfica durante o DMT2. Além disso, as suplementações diminuíram estresse oxidativo através da melhoria dos níveis de MDA, atividades da SOD e GSH-PX nos eritrócitos. Os autores do estudo ainda descrevem que altas doses de suplementação de GR em pacientes diabéticos são necessárias para obter resultados mais precisos.

Outro estudo realizado por Araki et al. (2018) com 33 pacientes que apresentavam câncer de células renais (CCR) avançado, designados para realizar uma terapia com Inibidores de tirosina quinase (TKI) e GR na dose de 900mg/kg, demonstrou que o ensaio clínico com GR exerceu efeitos protetores contra fadiga e anorexia induzidas por TKI e diminuiu a redução ou descontinuação da dose de TKI, sendo a GR benéfica em manter a qualidade de vida e a adesão à medicação em pacientes com CCR tratados com TKI.

Da mesma forma, Malekinejad et al. (2016) descreveram que a administração de geleia real de uma maneira dose-dependente resultou em um aumento significativo na capacidade antioxidante total reduzida pelo paclitaxel. No estudo a GR foi capaz de reduzir os níveis de malondialdeído e óxido nítrico no coração induzido pela administração de paclitaxel, sugerindo que o efeito cardioprotetor da geleia real pode estar relacionado à supressão do estresse oxidativo. Nosso estudo também observou que a administração de doses altas, principalmente na forma de pós-tratamento a um dano genotóxico, apresenta ação antígeno-tóxica e antimutagênica, apresentando também uma correlação dose-resposta, principalmente no pós-tratamento. Embora ainda sejam necessários muitos estudos, acreditamos que a GR seja uma ferramenta potencial para aplicações clínicas na melhoria da qualidade de vida e do prognóstico de pacientes tratados com terapias anticâncer.

Nossos resultados demonstraram que a administração de GR, independente da dose, não apresentou ação genotóxica. Além disso, em relação a ação antígeno-tóxica num modelo de pré-tratamento, a melhor dose foi a dose de

150mg/kg. Já no pós-tratamento, todas as doses apresentaram redução dos danos causados no DNA, sendo a dose de 1000mg/kg a melhor, pois a medida que a dose aumentava diminuía o dano no DNA. Além disso, a GR também não apresentou ação mutagênica quando observamos os grupos que ingeriram GR nas três doses. No entanto, a mesma apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo que recebeu o MMS, ocorrendo uma diminuição no número de eritrócitos policromáticos micronucleados e demonstrando sua capacidade antimutagênica. E da mesma forma, no ensaio de antimutagênese, a GR apresentou uma correlação significativa em relação a aumento de dose x diminuição do dano.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a administração de GR é eficaz na proteção e na reversão dos danos causados pelo agente alquilante MMS. Com isso, pode-se sugerir que a GR não apresenta ação genotóxica e mutagênica, e a administração de doses altas, principalmente na forma de pós-tratamento a um dano genotóxico, apresenta ação antigenotóxica e antimutagênica, apresentando ainda uma correlação dose-resposta no pós-tratamento.

O uso de compostos bioativos como a GR nas aplicações clínicas ainda não é amplamente difundido, portanto, mais evidências são necessárias para provar sua total segurança e qualidade necessária para alcançar todos os benefícios promissores à saúde. Dessa forma são necessárias mais experiências *in vivo* e em ensaios clínicos em humanos para se avaliar os mecanismos moleculares envolvidos e estabelecer de fato sua eficácia. Como perspectivas futuras, seria de grande valia avaliar a ação destas doses em outras patologias.

8. REFERÊNCIAS

- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Battino, M. Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 2013, 20(5), 621–638.
- Abdel-Hafez, S. M. N., Rifaai, R. A., & Abdelzaher, W. Y. Possible protective effect of royal jelly against cyclophosphamide induced prostatic damage in male albino rats; a biochemical, histological and immuno-histo-chemical study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 15–23. 2017.
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., & Li, J. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 382. 2020.
- Alvarez-Suarez J. M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 2010;3(1):15–23.
- Alu'datt, M.H.; Rababah, T.; Sakandar, H.A.; Imran, M.; Mustafa, N.; Alhamad, M.N.; Mhaidat, N.; Kubow, S.; Tranchant, C.; Al-Tawaha, A.R. Fermented food-derived bioactive compounds with anticarcinogenic properties: Fermented royal jelly as a novel source for compounds with health benefits. In *Anticancer Plants: Properties and Application*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 141–165.
- Al-Waili, N. S., Al-Waili, F. S., Akmal, M., Ali, A., Salom, K. Y., & Ghamdi, A. A. A. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. *Archives of Medical Science*, 2014, 2, 246–250.
- Araki, K., Miyata, Y., Ohba, K., Nakamura, Y., Matsuo, T., Mochizuki, Y., & Sakai, H. Oral Intake of Royal Jelly Has Protective Effects Against Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Toxicity in Patients with Renal Cell Carcinoma: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 6;1, 2018.
- Arzi A, Olapour S, Yaghooti H, Sistani Karampour N. Effect of royal jelly on formalin induced-inflammation in rat hind paw. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2015;10(1):22466.
- Avila J, Gómez-Ramos A, Soriano E. Variations in brain DNA. *Front Aging Neurosci*. 2014 Nov 25; 6:323.
- Azab K. S., Bashandy M, Salem M, Ahmed O, Tawfik Z, Helal H. Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats. *North Am J Med Sci*. 2011; 3:268-276.
- Basu AK, Nohmi T. Chemically-Induced DNA Damage, Mutagenesis, and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018,19(6):1767.

- Boiteux, S., & Guillet, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 3(1), 1–12. 2004.
- Bossa C., Benigni R., Tcheremenskaia O., Battistelli C.L. (Q)SAR Methods for Predicting Genotoxicity and Carcinogenicity: Scientific Rationale and Regulatory Frameworks. In: Nicolotti O. (eds) *Computational Toxicology. Methods in Molecular Biology*, 2018. 1800, 447-473;
- Cavusoglu K., Yapar K., Yalcin E., Royal Jelly (Honey Bee) Is a Potential Antioxidant Against Cadmium-Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Albino Mice. *Journal of Medicinal Food*, 2009, 12 (6) 1286–1292;
- Cemek M., Aymelek F., Büyükkuroğlu M. E., Karaca T., Büyükben A., Yilmaz F. Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (10): 2827-2832.
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235-263.
- Chen YF, Wang K, Zhang YZ, Zheng YF, Hu FL. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Three Fatty Acids from Royal Jelly. *Mediators Inflamm*. 2016:358 3684.
- Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodríguez P, Manna PP, Zhang J, Bravo Lamas L, Martínez Flórez S, Agudo Toyos P, Quiles JL, Giampieri F, Battino M. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2018;23(9):2322.
- Ciccia, A., Elledge, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 2010. 40(2), 179–204.
- Cornara L., Biagi M., Xiao J., Burlando B., Therapeutic Properties of Compounds from Different Honeybee Products. *Front. Pharmacol*. 2017, 8. 412.
- De Flora, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998.402(1-2), 151–158.
- Delkhoshe-Kasmaie F., Malekinejad H., Khoramjouy M., Rezaei-Golmisheh A., Janbaze-Acyabar H.; Royal jelly protects from taxol-induced testicular damages via improvement of antioxidant status and up-regulation of E2f1. *Syst Biol Reprod Med*, 2014; 60(2): 80–88.
- Denisow, B., Denisow-Pietrzyk, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(13), 4303–4309.
- Erdtmann, Bernardo. A genotoxicidade nossa de cada dia. In: SILVA, Juliana; ERDTMANN, Bernardo; HENRIQUES, João P.. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

Fagundes GE, Damiani AP, Borges GD, Teixeira KO, Jesus MM, Daumann F, Ramlov F, Carvalho T, Leffa DD, Rohr P, Moraes De Andrade V. Effect of green juice and their bioactive compounds on genotoxicity induced by alkylating agents in mice. *J Toxicol Environ Health A*. 2017;80(13-15):756-766.

Fratini F., Cilia G., Mancini S., Felicioli A Royal jelly: an ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol Res*. 2016; 192: 130-141.

Galaly S, Abdella E, Mohammed H. khadrawy S, Effects of royal jelly on genotoxicity and nephrotoxicity induced by valproic acid in albino mice. *Beni-suef University Journal of Basic Applied Sciences* 2014.3, 1-15.

Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M. Antioxidant and protective effects of Royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016.14(8):519-26.

Gu H, Canção IB, Han HJ, Lee NY, Cha JY, Filho YK, Kwon J. Antioxidant Activity of Royal Jelly Hydrolysates Obtained by Enzymatic Treatment. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 38 (1): 135-142. 2018.

Honda Y, Araki Y, Hata T, Ichihara K, Ito M, Tanaka M, Honda S. 10-Hydroxy-2-decenoic Acid, the Major Lipid Component of Royal Jelly, Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans* through Dietary Restriction and Target of Rapamycin Signaling. *J Aging Res*. 2015; 425261.

Huang S., Zhang C., Wang K., Q. Li G., Hu F.; Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 2014, 19, 19610-19632.

Ibrahim A, Eldaim MA, Abdel-Daim MM. Nephroprotective effect of bee honey and royal jelly against subchronic cisplatin toxicity in rats. *Cytotechnology*. Aug;68(4):1039-48. 2016.

Inoue S., Koya-Miyata S., Ushio S., Iwaki K., Ikeda M., Kurimoto M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. *Experimental Gerontology*, 2003, 38, 965–969.

Jenkhetkan, W.; Thitiorul, S.; Jansom, C.; Ratanavalachai, T. Genoprotective effects of thai royal jelly against doxorubicin in human lymphocytes in vitro. *Nat. Prod. Commun.* 2018,

Kada T, Shimoi K Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *Bioessays* 7:113–116, 1987.

Kamakura, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 2011. 473(7348), 478–483.

Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2011:981793.10.

Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, et al. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2009;61(2):123-132.

Keizo KOHNO, Iwao OKAMOTO, Osamu SANO, Norie ARAI, Kanso IWAKI, Masao IKEDA & Masashi KURIMOTO (2004) Royal Jelly Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004. 68(1), 138–145.

Khan MS, Abul Qais F, Ahmad I, Hussain A, Alajmi MF. Genotoxicity inhibition by *Syzygium cumini* (L.) seed fraction and rutin: understanding the underlying mechanism of DNA protection. *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(2):156-171.

Khazaei F., Ghanbari, E., Khazaei, M. Protective Effect of Royal Jelly against Cyclophosphamide-Induced Thrombocytopenia and Spleen and Bone Marrow Damages in Rats. *Cell J.*; 22(3): 302-309. 2020.

Khazaei M., Ansarian A., Ghanbari E., New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review; *Journal of Dietary Supplements*. 2017 15; 757-775.

Kocot J., Kielczykowska M., Luchowska-Kocot D., Kurzepa J., Musik I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 7074209. 29.

Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. Royal Jelly Inhibits Kolayli S., Sahin H., Can Z., Yildiz O., Malkoc M., Asadov A. A member of complementary medicinal food: anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. 2016;21(4):43–48.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000; 455(1-2):155-66.

Li, X., Huang, C., Xue, Y. Contribution of Lipids in Honeybee (*Apis mellifera*) Royal Jelly to Health. *Journal of Medicinal Food*, 2013. 16(2), 96–102.

Liao, W., McNutt, M. A., & Zhu, W. GThe comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 2009.

Lundin C., North M., Erixon K., Walters K., Jenssen D., Goldman A. S. H., Helleday T.; Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33,12 3799–3811.

Malekinejad H., Ahsan S., Delkhosh-Kasmaie F., Cheraghi H., Rezaei-Golmisheh Um., Janbaz-Acyabar H.; Cardioprotective effect of royal jelly on paclitaxel-induced cardiotoxicity in rats. *Irã J Basic Med Sci*. 2016; 19 (2): 221-7.

Mauro, M. O., M. T. Monreal, M. T. Silva, J. R. Pesarini, M. S. Mantovani, L. R. Ribeiro, J. B. Dichi, C. M. Carreira, and R. J. Oliveira. 2013. Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin in vivo. *Genet Mol Res* 12:228.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1990; 239(1):29-80.

Miyata Y, Sakai H. Anti-Cancer and Protective Effects of Royal Jelly for Therapy-Induced Toxicities in Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3270.

Mohamed, A. A.-R., Galal, A. A. A., & Elewa, Y. H. A. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. *Acta Histochemica*, 2015, 117(7), 649–658.

Park HM, Cho MH, Cho Y, Kim SY. Royal jelly increases collagen production in rat skin after ovariectomy. *J Med Food.* 2012;15(6):568-75.

Pasupuleti V.R., Sammugam L., Ramesh N., Gan, S.H. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 21.

Poehlmann, A., Roessner, A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathology - Research and Practice*, 2010. 206(9), 591–601.

Pourmoradian S., Mahdavi R., Mobasser M., Faramarzi E., Mobasser M. Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chin J Integr Med.* 2014; 20(5):347-352.

Ramadan, M. F., Al-Ghamdi, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(1), 39–52.

Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., & Sugunan, V. S. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, 44, 255–264. 2018.

Silici S., Ekmekcioglu O., Kanbur M., Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Urology.* 2009; 74 (3): 545-551.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1):184-91.

Słoczyńska K., Powroźnik B., Pękala E., Waszkielewicz A.A.M., Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genetics* 2014, 55:273–285.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.

Tokunaga, K., Yoshida, C., Suzuki, K., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., Mishima, S. Antihypertensive Effect of Peptides from Royal Jelly in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(2), 189–192.

Traube FR, Carell T. The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation. *RNA Biol.* 2017 14(9):1099-1107.

Tseng, J.-M., Huang, J.-R., Huang, H.-C., Tzen, JTC, Chou, W.-M., Peng, C.-C. Facilitative production of an antimicrobial peptide royalisin and its antibody via an artificial oil-body system. *Biotechnology Progress*, 2010. 27 (1), 153-161.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., e Pérez-Álvarez, JA Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly *Journal of Food Science*, 2008, 73 (9), R117-R124.

Watanabe S., Suemaru K., Takechi K., Kaji H., Imai K., Araki H. Oral mucosal adhesive films containing royal jelly accelerate recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. 2013;121(2):110–118.

Weeden, C. E., Asselin-Labat, M.-L. Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2018, 1864(1), 89–101.

Zhang S, Shao Q, Geng H, Su S. The effect of royal jelly on the growth of breast cancer in mice. *Oncol Lett.* 2017, 14(6):7615-7621.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO DOS ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **12/03/2019**.

Título do projeto	Influência do uso de geleia real sobre a genotoxicidade induzida por agente alquilante em camundongos.
Project title	Influence of the use of royal jelly on the genotoxicity induced by alkylating agent in mice.
Número do protocolo Protocol number	070/2018-2 versão 2
Pesquisador principal Principal Investigator	Vanessa Moraes de Andrade
Pesquisadores Researchers	Marina Lummertz Magenis, Adriani Paganini Damiani, Natália Rossa.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/04/2019 a 17/04/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/Swiss
No de animais	66
Idade/Peso	60 dias/30-35g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Crícoma, 12 de Março de 2019.