

ATIVIDADE PROLIFERATIVA DO EXTRATO AQUOSO DE *GANODERMA SP.* EM HEPATÓCITOS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

LUÍZE GARCIA BLOTTA DE MELO¹; CLEITON JESUS ANDRADE PEREIRA²;
NATÁLIA KOMMLING VILELA²; RAFAELY PICCIONI ROSADO²; JANICE
LUHERING GIONGO³; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – luizegarmel@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - andradec556@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - nataliakvilela@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - rafaelypiccioni@gmail.com

³Universidade Federal de Rio Grande (FURG) – janicegiongo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Ganoderma* são fungos Poliporos decompositores de madeira, que pertencem ao filo Basidiomycota e apresentam esporos característicos de parede dupla e aparência de câmara. Existem 193 espécies de *Ganoderma* sp. descritas até o momento, de acordo com evidências morfológicas, filogenéticas e moleculares. Algumas espécies incluem *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma aplanatum* e *Ganoderma australe*. São predominantemente parasitas e saprófitas, sendo seletivos quanto aos seus substratos ao parasitar arbóreas específicas (HE et al., 2024).

Os metabólitos extraídos de *Ganoderma* spp. são utilizados como agentes antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e atividades antienvelhecimento. Seus extratos são amplamente aplicados no tratamento de hepatite, hipercolesterolemia, diabetes, leucopenia, aterosclerose, hemorroidas e hipertensão (BLUNDELL et al., 2023).

O zebrafish (*Danio rerio*) é utilizado como modelo experimental devido ao seu tamanho (3-4 cm de comprimento) e sua capacidade reprodutiva prolífica, com desovas semanais que geram centenas de ovos fertilizados. Além da transparência embrionária, que facilita a visualização de seu desenvolvimento. Esse modelo compartilha semelhanças fisiológicas com humanos, incluindo genéticas, metabólicas e anatômicas. Tornando-o ideal para estudos sobre doenças hepáticas humanas e avaliação de bioatividade e toxicidade de substâncias (KIM; SO; SHIN, 2023; LIN et al., 2022; TOKUMARU et al., 2024).

Os hepatócitos são fundamentais na capacidade regenerativa do fígado e manutenção do metabolismo. Investigar o desenvolvimento da proliferação celular de hepatócitos permite entender mecanismos de reparo tecidual e tratamentos para doenças hepáticas. Já foi constatado o processo de plasticidade celular em modelo de Zebrafish. Os autores relatam que suas células epiteliais do ducto biliar transdiferenciam-se em hepatócitos e repovoam o fígado após uma perda extrema de hepatócitos (PU; ZHOU, 2022).

A espécie *G. lucidum* já investigada, apresentou efeitos hepatoprotetores em doenças como câncer de fígado, doença hepática gordurosa não alcoólica, hepatite B, fibrose hepática e lesões causadas por tetracloreto de carbono (CCl₄) e α-amanitina. Seus mecanismos de hepatoproteção incluem a modulação de enzimas hepáticas, supressão da β-glucuronidase e manutenção da homeostase do cálcio hepatocelular (AHMAD et al., 2023). Os polissacáideos de *G. lucidum* (GLPS) apresentaram efeitos protetores contra hepatotoxicidade induzida por CCl₄ *in vitro* em fatias de fígado de carpa (LIU et al., 2017). Além disso, os efeitos protetores de

lesão hepática também foram relatados para o extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* (ZHANG et al., 2022).

Os compostos e extrato aquoso de *Ganoderma* sp. se destacam devido aos seus efeitos hepatoprotetores e regeneração hepática, através de mecanismos como modulação enzimática e atividade antioxidante. Desse modo, são candidatos promissores tanto para prevenção quanto para tratamentos de doenças hepáticas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do extrato aquoso de *Ganoderma* sp. (GN) sobre a viabilidade celular em hepatócitos de Zebrafish.

2. METODOLOGIA

Os espécimes de *Ganoderma* sp. (GN) foram coletados em áreas vegetativas da região sul do Rio Grande do Sul - Brasil, seguindo metodologia de coleta *in situ* pelo método de caminhamento (FILGUEIRAS, T. S et al., 1994) e subsequente identificação macromorfológica. O método de extração foi realizado por maceração dinâmica (SIMÕES et al., 2007).

A linhagem celular foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ). Os hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*), linhagem ZF-I (cód. 0256) foram previamente cultivados seguindo metodologia descrita por Ferrer et al. (2024).

A contagem celular foi feita em câmara de Neubauer com coloração celular por azul de tripan (0,4% m/v), após contagem dos quadrantes calculou-se o valor da suspensão celular a ser utilizada usando a fórmula: N células $\text{mL}^{-1} \times V1 = 1,106 \times 10 \text{ mL}$. Após, uma placa de 96 poços (KASVI®, Brasil) foi utilizada para realização do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). A placa foi preenchida com 100 μL da suspensão celular e levada a incubação por 24h a 28 °C para adesão celular na placa. Após 24h os tratamentos com o extrato aquoso de *Ganoderma* sp. foi aplicado em duplicata no teste de MTT. Em uma concentração inicial de 25 mg/mL foi adicionado 100 μL do extrato no primeiro poço e subsequentes 4 diluições seriadas. Os controles positivo e negativo foram realizados em duplicata. Para o controle positivo foi adicionado 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO em um poço contendo 100 μL suspensão celular, e como controle negativo contendo apenas 100 μL suspensão celular. Após, as placas foram levadas a incubação por 24h a 28 °C sob leve agitação (~20/30 RPM).

Após incubação overnight, uma solução foi preparada contendo 50 mg de MTT (Invitrogen, EUA) e 10 ml de PBS. Posteriormente foi adicionado 100 μL dessa solução em cada poço, a placa foi fechada e revestida com papel alumínio para impedir ação da luz e mantida incubada por 4h a 28 °C sob leve agitação (~20/30 RPM). Após esse período foi descartado o reagente MTT e adicionado 100 μL de DMSO em cada poço. Foi realizada a leitura em leitor de microplaca (Rosys Anthos 2010) nas faixas de absorbância de 570 nm e 630 nm.

A análise dos dados foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism 8. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de duplicatas. As médias foram comparadas usando Análise de Variância (ANOVA) unidirecional seguida pelo teste post-hoc de Dunnett.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de MTT avalia a viabilidade celular através da atividade metabólica de enzimas mitocondriais ativas e, de forma indireta, a proliferação celular. A porcentagem de viabilidade celular está apresentada na figura 1.

A exposição das células ao extrato aquoso de *Ganoderma* sp. (GN) apresentou viabilidade celular maior que o controle negativo (CN), onde continha apenas suspensão celular viável. Os valores acima de 100% na presença do extrato aquoso de *Ganoderma* sp. (GN) sugerem atividade de proliferação celular em todas concentrações analisadas. O extrato também não apresentou redução na atividade mitocondrial em nenhuma concentração utilizada.

Foi possível avaliar um efeito proliferativo em ZF-L na presença do extrato aquoso de *Ganoderma* sp. (GN). Nenhum dado da literatura utilizou o extrato aquoso de *Ganoderma* sp. em ZF-L para comparação de resultados.

Estes resultados contribuem e corroboram com evidências que indicam efeitos hepatoprotetores de espécies de *Ganoderma* sp em ratos. Os achados de Zhang et al. (2022), demonstraram que a lesão hepática aguda induzida nos grupos que receberam o extrato aquoso de esporos de *Ganoderma lucidum* diminuiu de forma dose-dependente, evidenciando efeito protetor do extrato sobre o fígado, reduzindo danos às células hepáticas.

As evidências de LIU et al., (2017) demonstraram que o tratamento com GLPS previneu a queda acentuada nos níveis de ATP, um marcador essencial da viabilidade celular, que ocorreu em amostras de fatias de fígado expostas ao CCl₄. O GLPS também foi capaz de reduzir as atividades elevadas das enzimas GOT, GPT e LDH, associadas ao dano hepático causado por CCl₄, sugerindo uma proteção eficaz da função hepática. Além disso, o GLPS aumentou significativamente as atividades das enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GSH-Px e T-AOC, indicando também que o mecanismo de proteção está relacionado ao fortalecimento das defesas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo.

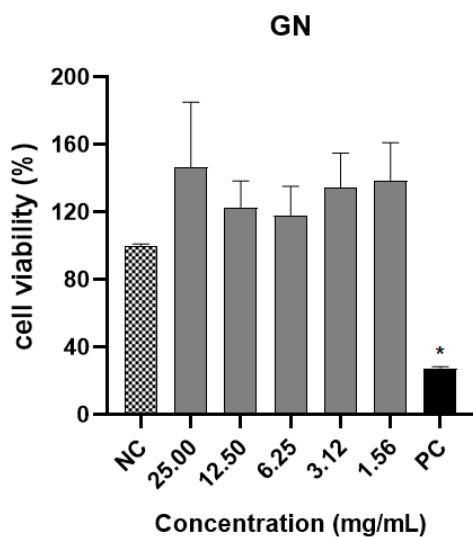


Figura 1. Comparação da taxa de viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT do extrato aquoso de *Ganoderma* sp. (GN). Os dados são representados como média \pm desvio padrão de duplicatas. Os dados foram analisados por Anova unidirecional seguido de teste post-hoc de Dunnett com nível de significância * $p<0,05$ em comparação ao controle negativo (NC).



Figura 2. Exemplar de *Ganoderma* sp. em substrato lenhoso. Fonte: autoral.

4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o extrato aquoso de *Ganoderma* sp. promoveu aumento na atividade mitocondrial e sugeriu proliferação celular em hepatócitos de *Danio rerio*, sem causar efeitos citotóxicos. Os resultados reforçam o potencial hepatoprotetor do extrato, corroborando com evidências de estudos anteriores em modelos animais. Além disso, este é o primeiro relato de avaliação da atividade do extrato aquoso de *Ganoderma* sp. em células ZF-L, contribuindo para a ampliação do conhecimento sobre suas propriedades bioativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M. F. et al. *Ganoderma lucidum: Novel Insight into Hepatoprotective Potential with Mechanisms of Action*. **Nutrients**, v. 15, n. 8, p. 1874, jan. 2023.
- BLUNDELL, R. et al. *The Phytochemistry of Ganoderma Species and their Medicinal Potentials*. **The American Journal of Chinese Medicine**, p. 1–24, 31 mar. 2023.
- FERRER, E. M. K. et al. *Effects of Imazethapyr-Based Herbicide Formulation in the Zebrafish (Danio rerio) Hepatocyte Cell Line (ZF-L): Cytotoxicity and Oxidative Stress*. **Journal of Environmental Protection**, v. 15, n. 6, p. 747–765, 14 jun. 2024.
- FILGUEIRAS, T. S et al. Caminhamento: um método expedido para levantamentos florísticos qualitativos. **Cadernos de geociências**, v. 12, n. 1, p. 39–43, 1994.
- HE, J. et al. *Two new species of Ganoderma (Ganodermataceae, Basidiomycota) from Southwest China*. **MycoKeys**, v. 106, p. 97–116, 19 jun. 2024.
- KIM, M.; SO, J.; SHIN, D. *PPAR α activation promotes liver progenitor cell-mediated liver regeneration by suppressing YAP signaling in zebrafish*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 18312, 25 out. 2023.
- LIN, F.-J. et al. *Recent development in zebrafish model for bioactivity and safety evaluation of natural products*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 31, p. 8646–8674, nov. 2022.
- LIU, Y. et al. *Protective effect of Ganoderma lucidum polysaccharide against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in precision-cut carp liver slices*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1209–1221, 1 out. 2017.
- PU, W.; ZHOU, B. *Hepatocyte generation in liver homeostasis, repair, and regeneration*. **Cell Regeneration**, v. 11, n. 1, p. 2, 6 jan. 2022.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento**. 6. ed. [s.l.] UFSC e UFRGS, 2007.
- TOKUMARU, T. et al. *Hepatic extracellular ATP/adenosine dynamics in zebrafish models of alcoholic and metabolic steatotic liver disease*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 7813, 3 abr. 2024.
- ZHANG, L. et al. *Antioxidant, hypoglycemic and protection of acute liver injury activities of Ganoderma lucidum spore water extract*. **Journal of Functional Foods**, v. 97, p. 105254, 1 out. 2022.