

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ

**RODRIGO CABRAL LUIZ**

**Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade  
de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei*  
Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, *in vitro***

LONDRINA  
2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ

**RODRIGO CABRAL LUIZ**

**Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade  
de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murill  
(Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, *in vitro***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

LONDRINA  
2002

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Oswaldo e Sueli pelo apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela orientação e confiança;

À banca examinadora composta pela Dra. Ilce Mara Syllós Cólus e Dra. Verônica Elisa Pimenta Vicentini, por suas sugestões e correções;

À coordenação do curso de Mestrado em Genética e Melhoramento;

À Universidade Estadual de Londrina e ao departamento de Biologia Geral;

À FAPESP pelo auxílio financeiro;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado;

Aos colegas de mestrado, especialmente a Zaira pela troca de informação e amizade;

Aos colegas da mutagênese pelo companheirismo.

## RESUMO

O *Agaricus blazei* Murill (ABM), cogumelo comestível nativo do Brasil, tem sido utilizado na medicina popular no tratamento de uma série de doenças, incluindo o câncer. No presente trabalho, extratos aquosos e orgânicos da linhagem AB97/11 do ABM foram testados em cultura de células de mamíferos. A avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica de extratos aquosos da linhagem AB97/11, na fase jovem e esporulada de desenvolvimento de seu basidiocarpo, foi realizada sobre células de hamster Chinês V79, utilizando-se o teste do micronúcleo e do cometa. As células foram tratadas na concentração de 0,15% de extratos em temperaturas diferentes: (1) gelado (4°C); (2) ambiente (21°C); e (3) aquecido (60°C). Os extratos foram aplicados em protocolos de mutagenicidade e antimutagenicidade (simultâneo simples, pré-incubação e contínuo) contra o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS). Para ambos os testes empregados o tempo de tratamento foi de 1h. Nas condições experimentais utilizadas os extratos não apresentaram atividade mutagênica. Não foi observada redução significativa na frequência de micronúcleos. No teste do cometa a proteção foi nula para todos os extratos. Os resultados demonstram que os extratos aquosos do *A. blazei* linhagem AB97/11, tanto na fase jovem, quanto na fase esporulada de desenvolvimento, não apresentam atividade antimutagênica contra o MMS em células V79. A avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos orgânicos da linhagem AB97/11, sobre células de hamster Chinês CHO-K<sub>1</sub> (selvagem) e CHO-xrs5 (deficiente em reparo), foi realizada através do teste de aberrações cromosômicas e do teste de troca entre cromátides irmãs. As células foram submetidas a várias concentrações de extratos do basidiocarpo preparados a partir de etanol absoluto (EtOH) e clorofórmio/metanol (3:1) (C/MetOH). Estes extratos foram aplicados em tratamentos contínuos de 12h, tanto de mutagenicidade como de antimutagenicidade. O agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS 1x 10<sup>-4</sup>M) foi utilizado como agente indutor de danos. Nas condições experimentais utilizadas foi observado: (a) efeito citotóxico na concentração 0,83% do extrato C/MetOH; (b) efeito anticlastogênico nas concentrações 0,06 e 0,09% do extrato etílico e nas concentrações 0,03 e 0,06% do extrato C/MetOH; (c) ausência de efeito protetor em células CHO-xrs5; e (d) ausência de efeito recombinogênico e antirrecombinogênico. Os resultados indicam que os extratos orgânicos da *A. blazei* linhagem AB97/11 apresentam atividade protetora do tipo bio-antimutagênica.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Classificação visual dos cometas. ....	21
<b>Figura 02</b> – Ilustração esquemática do mecanismo de formação do micronúcleo.....	22
<b>Figura 03</b> – Esquema da incorporação diferencial de 5-BrdU pelas cromátides irmãs.(modificado de Varella-Garcia, 1991). ....	26
<b>Figura 04</b> - Representação das estruturas do basidiocarpo maduro.....	28
<b>Figura 05</b> – Conversão da agaritina (a) presente em <i>Agaricus bisporus</i> em p-hidroxi-metilfenil-hidrazina (b) e o íon p-hidroximetilbenzeno-diazônio (c), com participação enzimática da $\gamma$ -glutamyltransferase (Harris, 1986).....	29
<b>Figura 06</b> – Foto do <i>Agaricus blazei</i> Murill, basidiocarpo (J) jovem e (E) esporulado. ....	30
<b>Figura 07</b> – Estrutura química do cerevisterol, de seu derivado <sup>1</sup> (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno) e do derivado <sup>2</sup> do ergosterol (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -triidroxiergosta-7-22,dieno-6-ona) presentes no <i>Agaricus blazei</i> Murill. ....	34
<b>Figura 08</b> – Comparação da estrutura química do ácido linoléico com o ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA). A área cinza aponta o grupo carbonil $\alpha$ -insaturado. ....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1 MUTAÇÃO .....	8
1.1.1 Agentes Mutagênicos .....	9
1.1.1.1 Metilmetanosulfonato .....	10
1.2 MECANISMOS DE REPARO .....	11
1.3 MUTAGÊNESE .....	12
1.3.1 Carcinogenese .....	13
1.3.2 Antimutagênese .....	14
1.3.3 Cultura de Células de Mamíferos .....	17
1.3.3.1 Teste do Cometa .....	19
1.3.3.2 Teste do Micronucleo .....	21
1.3.3.3 Teste de Aberrações Cromossômicas .....	23
1.3.3.4 Teste de Troca entre Cromátides Irmãs .....	25
1.4 COGUMELOS .....	26
1.4.1 Cogumelo do Sol ( <i>Agaricus blazei</i> Murill) .....	29
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	36
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3 ARTIGO 01:</b> Avaliação de extratos aquosos do cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murill contra a atividade mutagênica do metilmetanosulfonato sobre células V79. ....	38
<b>4 ARTIGO 02:</b> Antimutagenicidade de extratos orgânicos do cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murill em células CHO selvagem (K <sub>1</sub> ) e deficiente em reparo (xrs5) avaliada através do teste de Aberrações Cromossômicas e de Troca entre Cromátides Irmãs. ....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79

<b>ANEXOS</b> .....	89
ANEXO 01 :OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>AGARICUS BLAZEI</i> MURILL .....	90
ANEXO 02 :FOTOS DE MICROSCOPIA .....	92
Teste do Micronúcleo .....	92
Teste do Cometa.....	92
Teste de Aberrações Cromossômicas .....	93
Teste de Troca entre Cromátides Irmãs.....	93

## 1 INTRODUÇÃO

Em várias partes do mundo, principalmente no Oriente, os cogumelos têm sido utilizados na área da saúde, sendo incorporados em tinturas, chás, sopas e outras fórmulas medicinais. Alguns cogumelos medicinais apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico, reduzir a pressão arterial, reduzir os níveis de lipídeos no sangue, inibir tumores e agir como antiinflamatório ou antimicrobianos (Chang, 1996).

Uma espécie brasileira de cogumelo, o *Agaricus blazei* Murill, tem sido bastante destacado pelos meios de comunicação e pela comunidade científica, o que tem promovido um aumento de seu consumo junto à população. Desta forma torna-se necessário avaliar seus efeitos sobre o material genético, sejam eles prejudiciais ou vantajosos.

### 1.1 MUTAÇÃO

Embora os seres vivos apresentem sistemas de defesa de seus genomas, tais como: (i) processos metabólicos e farmacocinéticos que determinam a absorção, transporte e detoxificação de xenobióticos; (ii) mecanismos celulares de reparo do DNA e; (iii) defesa imunológica contra doenças como o câncer (Tardiff *et al.*, 1994), todos as espécies estão sujeitos à ação de agentes físicos, químicos ou biológicos nocivos a seu material genético (agentes mutagênicos).

Denomina-se mutação quando se observa uma alteração no DNA capaz de influenciar, ou não, a atividade normal da unidade genética onde ocorreu

(gene ou cromossomo) (Lewin, 2000), sem que esta alteração tenha surgido de processos naturais como segregação ou recombinação.

Quando ocorre em células somáticas, a mutação se restringe ao indivíduo, mas pode se propagar durante o crescimento e reposição de tecidos e está envolvida com doenças degenerativas crônicas, incluindo o câncer (De Flora, 1998). Em células germinativas a mutação pode ser transferida para as gerações seguintes (Rabello-Gay *et al.*, 1991), sendo um dos fatores responsáveis pela variabilidade genética das espécies ou por síndromes fisiológico-bioquímicas hereditárias.

### **1.1.1 Agentes mutagênicos**

A fonte de agentes mutagênicos é bastante variada, podem ser encontrados na natureza ou originados pela atividade humana. São alguns exemplos os radicais livres (Bianchi *et al.*, 1996), a idade, o estresse, as inflamações e as infecções (Donghui *et al.*, 1995), os contaminantes alimentares (Morales *et al.*, 1990; Ribas *et al.*, 1995; Heddle *et al.*, 2001), os poluentes atmosféricos (Cui *et al.*, 1996; Rosser *et al.*, 1996; Cherng *et al.*, 1996), os agrotóxicos (Carbonell *et al.*, 1995; Rehana *et al.*, 1996; Kong e Ma, 1999), os produtos farmacêuticos (Andrison *et al.*, 1995) e a exposição ocupacional (Maluf e Erdtmann, 2000) etc.

Entre os agentes mutagênicos destacam-se os agentes químicos que podem ser classificados como diretos ou indiretos. Agentes químicos diretos são capazes de atuar sobre o DNA sem ativação metabólica (i.e. metilmetanosulfonato),

enquanto os indiretos precisam ser metabolizados antes de interagir com o material genético (i.e. ciclofosfamida).

Com relação à dependência à fase S (de síntese de DNA) do ciclo celular, podem ser classificados em agentes S dependentes (ex.: metilmetanosulfonato) e S independentes (ex. bleomicina) (Brusick, 1987).

#### **1.1.1.1 Metilmetanosulfonato**

Um bom exemplo de agente mutagênico químico é o metilmetanosulfonato (MMS), um solvente utilizado na catalisação de reações industriais de polimerização, alquilação e esterificação (Vrzöc e Petras, 1997). O MMS é um alquilante monofuncional de ação direta S-dependente ( $S_{N2}$ ). Ao alquilar o DNA, o principal produto de sua atividade é o aducto  $N^7$ -metilguanina, outros aductos de menor frequência são a  $N^3$ -metiladenina e a  $O^6$ -metilguanina. As lesões induzidas pelo MMS são responsáveis diretamente pela origem das quebras de fita simples e indiretamente capazes de gerar danos cromossômicos (Garcia *et al.*, 2001). Por se tratar de um agente monofuncional as quebras de fita dupla produzidas pelo MMS, e que são observadas nos danos cromossômicos, envolvem a presença da base nitrogenada metilada responsável por um bloqueio da duplicação do DNA e o reparo por excisão. Garcia *et al.* (2001) demonstraram, em cultura de linfócitos humanos, que na concentração de  $4 \times 10^{-4}$  M o MMS é capaz de gerar fragmentos de DNA contendo de 600 a 2200 kb, imediatamente após 1h de tratamento.

## 1.2 MECANISMOS DE REPARO

Em eucariotos e procariotos o dano ao material genético pode ser minimizado por sistemas complexos que o reconheçam e o corrijam.

Em mamíferos é evidente a existência de enzimas capazes de remover os grupos alquil inseridos nas bases nitrogenadas por agentes alquilantes, semelhantes a O<sup>6</sup>-metilguanina metiltransferase (O<sup>6</sup>-meG) de *E. coli*, a qual é capaz de transferir tais grupos para um de seus resíduos de SH-cisteína. Além deste mecanismo, quando alquilada a base nitrogenada afetada pode ser reconhecida pelas DNA glicosilases (i.e. 3-mA DNA glicosilase II), responsáveis pela quebra da ligação glicosídica entre a base nitrogenada e a desoxirribose. Esta reação gera sítiosapurínicos ou apirimidínicos (sítios AP). A quebra da ligação glicosídica também pode ser espontânea. Os sítios AP são posteriormente removidos por excisão. AP-endonucleases hidrolisam a ligação fosfodiéster de sítios AP, gerando quebras que são reconhecidas pelas exonucleases 5'-3' e 3'-5', produzindo lacunas na fita simples de DNA (em eucariotos esta lacuna tem cerca de 21 nucleotídeos). Nos eucariotos a reconstrução da fita é realizada pela DNA polimerase  $\beta$ , que utiliza a fita complementar como molde para a duplicação e conseqüente reparo da fita danificada. O processo é finalizado com a ação da DNA ligase. Outro mecanismo que visa o reparo do sítio AP é da DNA-purina insertases, estas enzimas são capazes de inserir bases nitrogenadas corretas em sítios AP (Friedberg, 1984).

Em caso de quebra de fitas duplas (QFD), há a necessidade de participação do sistema do sistema de reparo NHEJ (non homologous end joining) e de recombinação. No reparo NHEJ ocorre a participação de proteínas heterodiméricas compostas das subunidades Ku70 e 80, tais proteínas ligam-se a

terminais não específicos de DNA, estabilizando a quebra, e recrutam uma quinase DNA-dependente (DNA-Pk) responsável pelo reparo. Neste mecanismo também existe a participação da DNA ligase IV associada com a proteína XRCC4. Este mecanismo não está totalmente esclarecido, mas participa da recombinação dos genes das imunoglobulinas. Outro sistema de reparo de fita dupla é a recombinação, mas não existem evidências diretas de sua existência em mamíferos (Lewin, 2000).

Os agentes mutagênicos e os sistemas de reparo do DNA têm sido alvo de estudos da mutagênese. Esta ciência visa identificar e elucidar seus mecanismos e busca encontrar compostos com atividade protetora sobre o material genético.

### **1.3 MUTAGÊNESE**

Desde o início dos anos 70, muitos procedimentos científicos têm sido publicados e utilizados na detecção do potencial carcinogênico e mutagênico de agentes físicos, químicos e biológicos. Desde então, muitos testes têm sido desenvolvidos para aumentar o conhecimento sobre seus mecanismos moleculares de ação (Reifferscheid e Heil, 1996). Desde o surgimento desta ciência todos os aditivos químicos, agrotóxicos, produtos farmacêuticos, materiais de embalagem e cosméticos têm sido avaliados em relação ao seu potencial mutagênico (Vanhauwaert *et al.*, 2001).

Os bioensaios mutagênicos avaliam o agente a ser testado, na presença e ausência de sistemas metabólicos de ativação. Podem ser aplicados, *in vivo* e *in vitro*, em sistemas que utilizem bactérias, vegetais ou animais (Brusick,

1987). A utilização de mamíferos seja ela *in vivo* ou *in vitro*, é bastante aceita pela comunidade científica, pois permite um certo grau de extrapolação dos resultados para os possíveis efeitos sobre o homem, principalmente com relação a carcinogenicidade de alguns compostos.

### **1.3.1 Carcinogenese**

Os componentes prevalentes do estilo de vida, tais como tradições dietéticas e o uso de tabaco e de álcool, contribuem para a maioria dos tipos de câncer de uma localidade (Wynder *et al.*, 1991; Taioli *et al.* 1991). Dietas ricas em gordura estão relacionadas com a elevada frequência de câncer de mama, cólon, próstata, pâncreas, ovário e endométrio (Moon e Micozzi, 1992; Lieber, 1993; Wynder e Hoffmann, 1994).

Entre os múltiplos passos da carcinogênese encontram-se os danos ao material genético, que podem ser produzidos agentes mutagênicos e são responsáveis pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (McKelvey-Martin *et al.*, 1998). Como resultado a célula passa a apresentar descontrole em seus mecanismos de divisão celular, adquirindo um alto potencial de mitose. Algumas células podem ser capazes de invadir outros tecidos, levando à metástase (Kuroda e Hara, 1999). Outras substâncias atuam sobre a divisão celular, mas não são mutagênicas (Trosko, 1997). O estrógeno, por exemplo, não apresenta atividade mutagênica, mas está associado ao desenvolvimento e proliferação de alguns tipos de câncer de mama (Schwartz, 2001).

### 1.3.2 Antimutagênese

Como os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados à carcinogênese, a possibilidade de controle da resposta celular contra os mesmos, principalmente através da dieta, tem aberto uma nova fronteira para a prevenção e controle do câncer (Trichopoulou *et al.*, 1995), desta forma a identificação de agentes inibidores de mutação deverá ser útil na descoberta de compostos anticarcinogênicos (Simič *et al.*, 1998).

Qualquer substância capaz de reduzir a freqüência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é denominada antimutagênica. Posteriormente as mesmas podem ser classificadas como bio-antimutagênicas ou desmutagênicas (Waters *et al.*, 1990; Grüter *et al.*, 1990).

As substâncias bio-antimutagênicas atuam como moduladores do reparo e replicação do DNA, agem ao nível celular: (i) aumentando a fidelidade na replicação do DNA ou; (ii) estimulando o reparo livre de erro em danos no DNA ou; (iii) inibindo os sistemas de reparo sujeitos à erro (Hartman e Shankel, 1990; De Flora, 1998; Simič *et al.*, 1998). Um exemplo de bio-antimutagênico é a galato-epigallocatequina do chá verde japonês, a qual demonstrou atividade estimuladora sobre a DNA polimerase III do *Bacillus subtilis* (Kada e Shimoi, 1987).

Substâncias desmutagênicas são capazes de inativar um agente mutagênico por interação direta. Dois exemplos de desmutagênicos são as peroxidases do repolho, capazes de inativar enzimaticamente os pirolisados do triptofano, e as fibras vegetais dietéticas, capazes de adsorver agentes mutagênicos (Kada *et al.*, 1985; Grüter *et al.*, 1990). Há pelo menos três modos de ação dos

agentes desmutagênicos: (i) inativação química ou enzimática, na qual o agente mutagênico é neutralizado após passar por um processo de metabolização, principalmente das enzimas de fase II, e encaminhados para excreção; (ii) prevenção da formação de espécies ativas, seja por inativação de enzimas metabolizadoras, como o citocromo P450, ou por ligação direta com o agente mutagênico impedindo sua ativação; (iii) seqüestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impedindo que os mesmos entrem em contato com o material genético (Kada e Shimoi, 1987; Hartman e Shankel, 1990; Ferguson, 1994; De Flora, 1998).

Os anticarcinogênicos (ou antitumorais) são substâncias capazes de impedir, retardar ou reduzir o surgimento ou desenvolvimento de tumores, podem ser classificados em substâncias que inibem a: (i) formação de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos a partir de precursores; (ii) chegada do carcinogênico a células específicas, ou reagem com células específicas, também denominados agente de bloqueio; (iii) expressão de características malignas, também chamados de agentes supressores (Kuroda e Hara, 1999).

O uso diário de produtos antimutagênicos e anticarcinogênicos pode ser uma forma de prevenção do câncer e outras doenças genéticas, quimioprevenção (Gomes *et al.*, 1996; Surh *et al.* 1996). Um agente quimiopreventivo deve ter cinco qualidades: (i) apresentar pouco ou nenhum efeito colateral; (ii) ter alta eficácia; (iii) ser possível a administração por via oral; (iv) ter um mecanismo de ação conhecido; e (v) ser de baixo custo (Ferguson, 1994).

Na mutagênese o potencial quimiopreventivo de uma determinada substância é avaliado ao testar a mesma contra um agente mutagênico com

atividade conhecida (ex. MMS), permitindo a observação da redução ou não das lesões produzidas.

A atividade antimutagênica tem sido demonstrada em frutas e vegetais (Kada *et al.*, 1985). Várias substâncias obtidas a partir de fontes naturais têm sido isoladas, identificadas e alguns dos mecanismos de sua atividade estão sendo esclarecidos. A *N*-acetil-l-cisteína, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), os isotiocianetos aromáticos, as clorofilas e derivados, a glutatona, a vitamina C, a vitamina E, a vitamina A, os flavonóides, alguns ácidos graxos e as fibras dietéticas são algumas das substâncias antimutagênicas conhecidas encontradas na dieta (Gebhart, 1974; Ames, 1983; Ames, 1986; Hartman e Shankel, 1990; Odin 1997; Lohman *et al.*, 2001).

No setor alimentar, os cogumelos comestíveis têm sido bastante pesquisados em relação à sua capacidade mutagênica, antimutagênica e antitumoral. Algumas espécies como o *Lentinula edodes*, o *Craterellus cornucopioides*, o *Agaricus abruptibulbus*, o *Cantharellus cibarius*, o *Lactarius lilacinus*, o *Lyophyllum connatum*, o *Xerocomus chrysenteron* e o *Agaricus blazei* já demonstraram atividade antimutagênica (Grüter *et al.*, 1991 e Lohman *et al.*, 2001).

Por demonstrar mostrar eficiência na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos, os sistemas de testes *in vitro* têm sido muito utilizados pela a mutagênese. Entre estes sistemas encontra-se a cultura de células de mamíferos.

### 1.3.3 Cultura de células de mamíferos

A aplicação de testes de mutagênese e antimutagênese em células de mamíferos *in vitro* apresenta grandes vantagens: (i) facilidade de padronização das condições experimentais (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo); (ii) possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, além de serem ensaios econômicos e de boa reprodutibilidade; (iii) o material é relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; (iv) a organização dos cromossomos e do seu DNA é a mesma das células *in vivo*. O potencial mutagênico de xenobióticos pode ser avaliado através de ensaios *in vitro* desde que obedecem a critérios básicos como: sensibilidade para revelar com facilidade e precisão estatística mesmo um pequeno efeito mutagênico, reprodutibilidade e capacidade para avaliar eventos genéticos que possam estar diretamente relacionados ao homem, fornecendo uma estimativa de risco ou nível de segurança para a população exposta (Rodrigues, 1991).

Na mutagênese duas células de mamíferos, as células V79 (fibroblasto de pulmão de hamster Chinês) e CHO-K<sub>1</sub> (células de ovário de hamster Chinês), são bastante empregadas em testes como o micronúcleo (Johnston *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2000), cometa (Olive *et al.*, 1992; Klaude *et al.*, 1996; Friauff *et al.*, 2001), aberrações cromossômicas (Matsuoka *et al.*, 1997; Sasaki *et al.* 1994; Alves *et al.*, 2000) e troca entre cromátides irmãs (Cortés *et al.*, 1994). Estas células apresentam algumas vantagens, tais como: (a) facilidade de crescimento em cultivo; (b) pequeno número de cromossomos; (c) ciclo celular curto (10 a 12 horas) e; (d) fornecem uma alta frequência de metáfases analisáveis. No entanto apresentam algumas desvantagens como: (i) cariótipo variável (21±1); (ii)

geralmente formam populações celulares não sincrônicas, (iii) apresentam uma considerável heterogeneidade nos tempos de ciclo celular e; (iv) são células transformadas (Preston *et al.*, 1987).

Além destas células selvagens, a mutagênese também se utiliza células deficientes em mecanismos de reparo, como a mutante xrs5 da CHO (Sakamoto-Hojo e Takahashi, 1991; Johnston *et al.*, 1997). A CHO-xrs5 apresenta deficiência na reunião de quebra de fitas duplas, por não produção da proteína Ku80, envolvida no reparo NHEJ (Johnston *et al.*, 1998). Células mutantes deficientes em reparo de fita dupla são suscetíveis à radiação X, mas apresentam sensibilidade cruzada com a bleomicina e com agentes alquilantes. Estudos citogenéticos demonstram que estas linhagens celulares apresentam uma maior quantidade de aberrações cromossômicas espontâneas e a freqüências de aberrações induzidas por agentes, como o metilmetanosulfonato é bem maior quando comparada com as linhagens selvagens, principalmente na freqüência de quebras cromatídicas (Stopper *et al.*, 1997).

*In vitro* as células V79, CHO-K<sub>1</sub> e CHO-xrs5 são cultivadas na forma de cultura de adesão em monocamada, utilizando um meio de cultivo como fonte de nutrientes com acréscimo de soro bovino fetal, para o fornecimento de fatores indutores de mitose. Nestas condições as células podem ser liberadas dos frascos de cultivo através de uma enzima proteolítica (tripsina) e transportadas para novos frascos de cultivo, onde poderão ser mantidas em crescimento ou serem submetidas aos tratamentos conforme o protocolo e o teste a ser empregado.

### 1.3.3.1 Teste do cometa

O teste do cometa visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a um cometa.

Os primeiros pesquisadores que utilizaram a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydenberg e Johanson em 1978 (Tice, 1995). Östling e Johanson em 1984 incluíram no teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), o que permitiu um aumento na sensibilidade. A eletroforese em pH alcalino (pH>13) foi introduzida por Singh *et al.* (1988) e transformou o cometa em uma técnica poderosa na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios álcáli-lábeis, *in vivo* e *in vitro*.

O teste do cometa é um método rápido, simples e sensível para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células, sendo particularmente valioso na detecção de diferenças intercelulares, nos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer célula eucariótica, onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo com uma amostragem bastante pequena de células. Além disto os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade do teste do cometa em detectar danos em células individuais é comparável a outros métodos que avaliam danos em uma população de células (Olive *et al.*, 1992; Tice, 1995; Ribas, 1995; Ross *et al.*, 1995; Fairbairn *et al.* 1995; Klaude *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1998; Tice *et al.*, 2000; Frieauff *et al.*, 2001).

Por todos estes motivos o teste do cometa tem sido empregado na avaliação de danos no DNA promovidos por agentes físicos e químicos, no monitoramento ambiental e até mesmo na área clínica (Anderson e Plewa, 1998).

De maneira geral o teste envolve a deposição de células em agarose, sobre uma lâmina de microscópio, seguido de lise, desnaturação do DNA e eletroforese em pH alcalino (pH >13), e finalmente a análise dos cometas gerados pelo DNA fragmentado. Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e condições do experimento nas quais os testes são conduzidos, variam consideravelmente. Muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose LMP, composição da solução de lise e tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese e as condições de corrida, a coloração do DNA, entre outros (Olive *et al.*, 1992; Speit e Hartmann, 1999).

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente (Kobayashi, 1995), utilizando-se coloração com um agente intercalante fluorescente (brometo de etídio) e um microscópio de fluorescência. Desta forma os cometas (Fig. 01) poderão ser classificados em: (classe 0) núcleos não danificados e que não apresentam cauda; (classe 1) núcleos com cauda menor que o diâmetro do núcleo; (classe 2) núcleos com cauda de tamanho entre 1 a 2 X o diâmetro do núcleo; (classe 3) núcleos com cauda 2 X o diâmetro do núcleo. Núcleos de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizadas (Speit *et al.*, 1996).

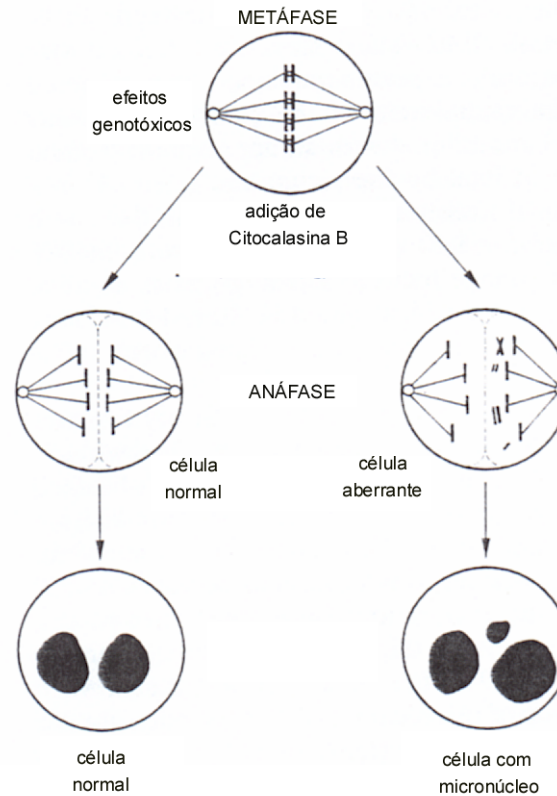


**Figura 01** - Classificação visual dos cometas.

### 1.3.3.2 Teste do micronúcleo

Os Micronúcleos (MN) são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma. Aparecem na telófase e são resultado de fragmentos acêntricos (originados de quebra isocromatídicas ou cromatídicas) ou de disfunções no fuso mitótico (Fig. 02). Desta forma podem ser gerados por agentes clastogênicos e aneugênicos. Pode haver um ou mais MN por célula, e tais corpúsculos não devem apresentar qualquer conexão estrutural com o núcleo principal (Rabello-Gay *et al.*, 1991; Mersch *et al.*, 1996; Kirsch-Volders e Fenech, 2001).

A aplicação do bloqueio da citocinese, com a citocalasina-B (Cyt-B), permite identificar células que tenham passado por um ciclo de mitose após o tratamento *in vitro*. Esta variação técnica tem transformado o teste do MN em uma ferramenta útil na triagem de danos genéticos (Fenech e Morley, 1985). A Cyt-B é um potente inibidor dos microfilamentos de actina, impedindo a polimerização dos mesmos na placa equatorial formada no final da telófase, desta forma observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese.



**Figura 02** – Ilustração esquemática do mecanismo de formação do micronúcleo.

Muitas variáveis podem afetar a reprodutibilidade e sensibilidade do teste do MN incluindo metodologia, variabilidade interindividual, composição química e pureza do composto a ser testado. Dentro dos aspectos metodológicos mais importantes encontra-se a concentração de Cyt-B. O uso de concentrações sub-ótimas (como de  $3\mu\text{g/ml}$ ) de Cyt-B para o bloqueio da citocinese poderia permitir que células binucleadas, que sofreram duas divisões, também sejam contabilizadas, superestimando os danos genéticos. No entanto, concentrações de Cyt-B diferentes ( $3$  e  $6\mu\text{g/ml}$ ) conduziram a resultados semelhantes (Surrallés *et al.*, 1995).

### 1.3.3.3 Teste de aberrações cromossômicas (AC)

As primeiras alterações cromossômicas induzidas foram analisadas nos anos 1930s por Karl Sax e colaboradores utilizando grãos de pólen de *Tradescantia*, posteriormente o uso de tratamento hipotônico, introduzido por Hsu em 1952, permitiu a análise detalhada dos cromossomos humanos, principalmente para diagnóstico (Tucker e Preston, 1996). No início dos anos 60, evidenciou-se que as aberrações cromossômicas podem ser induzidas por agentes químicos (Palitti, 1998). A análise de AC tem gerado muitas informações sobre os mecanismos de mutagenicidade induzida por agente químicos ou físicos, e tem sido utilizado como indicador de exposição humana a tais agentes (Galloway *et al.*, 1998).

Em 1988, o teste de AC, foi incluído entre o conjunto de testes de mutagenicidade para medicamentos, como teste complementar ao teste de AMES (Motoi, 1988). As ACs em células de mamíferos, têm sido muito utilizadas na mutagênese devido à facilidade na obtenção dos resultados, à sua precisão e à sua credibilidade na obtenção de resultados. O teste *in vitro* apresenta algumas vantagens, pois permite a realização de tratamentos em tempos e/ou fases específicas do ciclo celular que podem aumentar a sensibilidade do teste para alguns agentes químicos (Galloway, 1994).

A análise de ACs é restrita a células mitóticas em metáfase, pois somente nesta fase do ciclo celular o DNA está suficientemente condensado para ser observado na forma de cromossomo em microscópio óptico (Boei, 1996). As ACs podem ser detectadas na primeira divisão celular após a exposição de uma cultura de células a um agente mutagênico. Os tipos celulares mais utilizados são células V79, CHO-K<sub>1</sub> e linfócitos humanos (Swierenga *et al.*, 1991). Para a obtenção de

metáfases as células devem ser submetidas a tratamento com inibidores de polimerização do fuso mitótico, como a colchicina ou o colcemide.

As ACs podem ser classificadas como estruturais e numéricas. As aberrações numéricas podem ser originadas pela ação de agentes aneugênicos, responsáveis por uma segregação incorreta dos cromossomos durante a anáfase, observando perda ou ganho de cromossomos inteiros (Swierenga *et al.*, 1991). Enquanto as AC estruturais são alterações na estrutura cromossômica, visíveis microscopicamente, que envolvem quebra(s) de fita(s) do DNA, seguida(s) ou não de rearranjo anormal dos fragmentos do(s) cromossomo(s) quebrado(s). A quebra pode ser completa em uma única cromátide (quebra cromatídica) ou em ambas as cromátides (quebra isocromatídica), resultando na perda ou deleção de parte do material cromossômico, translocação ou outros rearranjos. São consideradas quebras quando a falta do material no cromossomo é maior do que a largura da cromátide ou quando há um deslocamento de uma ou ambas as cromátides em relação ao resto do cromossomo (Swierenga *et al.*, 1991). Também é possível observar outras aberrações, como anéis, cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos e outros rearranjos mais complexos, que geralmente levam à morte celular, pois promovem uma disfunção na distribuição do material genético durante um novo ciclo de divisão celular.

A contagem das ACs é realizada pela medida direta das lesões, o que oferece uma avaliação precisa da atividade clastogênica. O tipo de AC produzida depende do agente genotóxico, da fase do ciclo celular e do tempo de tratamento (Darroudi, 1990).

Através do índice mitótico, o teste de aberrações cromossômicas permite avaliar a morte celular e a qualidade da divisão celular dentro da cultura, o que permite a determinação de mais um efeito biológico, a citotoxicidade (Darroudi e Natarajan, 1985).

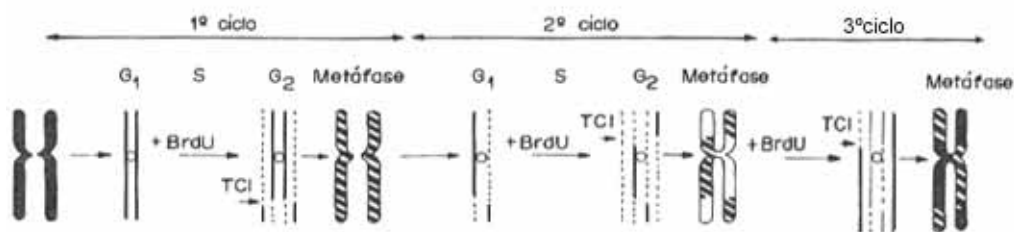
#### 1.3.3.4 Teste de troca entre cromátides irmãs

Trocas entre cromátides irmãs (SCEs – “Sister chromatides exchanges”) são manifestações citológicas de quebras que ocorrem no mesmo loco de duas cromátides de um cromossomo, seguidas de intercâmbio e reunião (Varella-Garcia, 1991). O Teste de SCE tem sido utilizado, *in vitro*, na detecção do potencial mutagênico (Matsuoka *et al.*, 2001), e deve ser considerado um complemento do teste de aberrações cromossômicas.

O mecanismo molecular de sua formação ainda é incompletamente compreendido. Ainda não está esclarecido se as SCEs podem ou não corrigir lesões no DNA. Existem dois modelos que explicam as SCEs, de acordo com o primeiro modelo, as SCEs são mediadas por recombinação homóloga, já o segundo modelo defende que, a topoisomerase II causa quebras transitórias de fita dupla de DNA durante a replicação, e a proximidade entre as extremidades pode resultar em uma rejunção incorreta das mesmas, causando as trocas. O segundo modelo tem sido mais aceito, pois muitos trabalhos têm demonstrado o envolvimento das DNA topoisomerasas na recombinação (Domínguez *et al.*, 2001).

A maioria dos agentes mutagênicos S dependentes, como o raio ultravioleta e os agentes alquilantes, são potentes indutores de SCE (Littlefield, 1982), mas as trocas também podem ocorrer espontaneamente em células em divisão (Ekmekci *et al.*, 1995). As trocas parecem ocorrer também nos pontos de junção entre as lacunas de replicação geradas pelos agentes mutagênicos, incluindo os agentes alquilantes monofuncionais, como o metilmetanosulfonato (Morris *et al.*, 1991; Cortés *et al.*, 1994).

O teste de SCE é possível de ser realizado graças à técnica de marcação diferencial das cromátides irmãs, que envolve a exposição celular a 5-BrdU por um ou dois ciclos de duplicação do DNA. A incorporação do 5-BrdU altera o empacotamento da molécula de DNA, tornando-a menos condensada e reduzindo sua afinidade por corantes após tratamentos especiais. Além disto a exposição ao 5-BrdU permite diferenciar quantos ciclos de duplicação ocorreram após sua introdução (Fig. 03). A coloração das lâminas pode ser feita com Hoechst 33258 e Giemsa (Varella-Garcia, 1991).



**Figura 03** – Esquema da incorporação diferencial de 5-BrdU pelas cromátides irmãs. (modificado de Varella-Garcia, 1991).

#### 1.4 COGUMELOS

Os fungos são seres eucariotos, heterotróficos, geralmente apresentam atividade saprófita ou parasitária. Dentre os fungos existem organismos unicelulares, aquáticos e parasitas de plantas e animais. São divididos em quatro classes: Arquimicetos, Ficomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos (Smith e Moss, 1985).

Uma classe de fungos bastante importante é a dos basidiomicetos, os quais são extremamente adaptados para habitar substratos sólidos encontrados no ambiente. Esta capacidade é fornecida pelo desenvolvimento em forma de filamento (hifas), que compõem um micélio complexo.

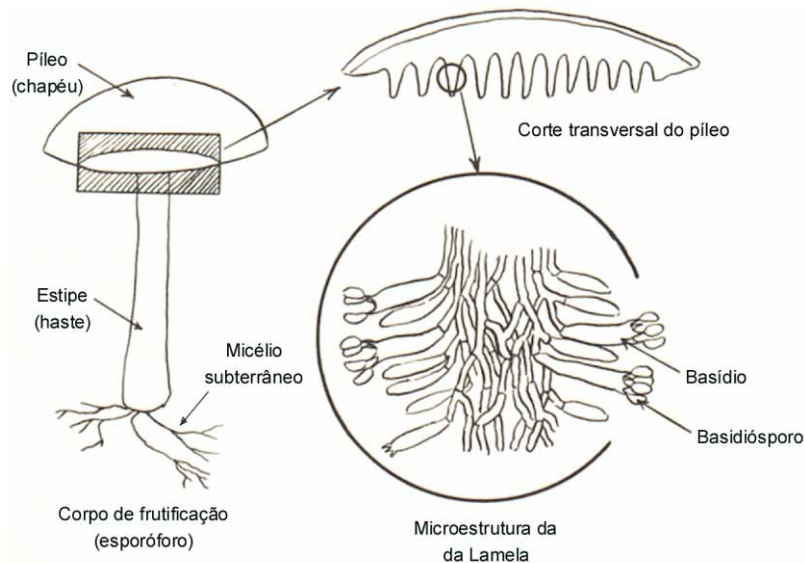
Quando os nutrientes do substrato começam a se exaurir, ocorre a diferenciação de hifas que originam um corpo de frutificação (basidiocarpo), portador do esporóforo responsável pela produção de esporos (Fig. 04). Os basidiocarpos macroscópicos são conhecidos popularmente como cogumelos (Smith e Moss, 1985).

O uso de cogumelos na alimentação ocidental encontra-se registrado na literatura romana e grega (Smith e Moss, 1985). No oriente os cogumelos são utilizados desde 100 a.C. (Chang, 1996). Embora os cogumelos sejam utilizados na alimentação, o conhecimento de suas atividades toxicológicas ainda é insuficiente. Com exceção dos cogumelos venenosos, a composição química destes fungos, em geral, é desconhecida.

Muitos fungos são capazes de produzir metabólitos secundários, sendo alguns deles pigmentos, substâncias de ação antimicrobiana ou toxinas para plantas e animais. As toxinas fúngicas podem promover: (i) o distúrbio na produção de energia celular; (ii) a inibição do transporte de glicose; (iii) a inibição da síntese de proteínas ou; (iv) a formação de aductos no DNA responsáveis pela carcinogênese e mutagênese de alguns cogumelos (Smith e Moss, 1985).

Embora alguns cogumelos contenham altos níveis de histidina livre, o que pode mimetizar a indução de colônias revertentes no teste de AMES/*Salmonella* (Harris, 1986), várias espécies de cogumelos foram avaliadas quanto a sua mutagenicidade utilizando este teste. Dentre elas 37 apresentaram atividade

mutagênica fraca com ou sem enzimas microssomais. Atividade mutagênica também foi encontrada em metabólitos fúngicos isolados: isoveleral do *Lactarius* sp., agaritina do *Agaricus bisporus* e espécies relacionadas, e  $\beta$ -nitraminoalanina do *Agaricus silvaticus* (Sterner *et al.*, 1982).

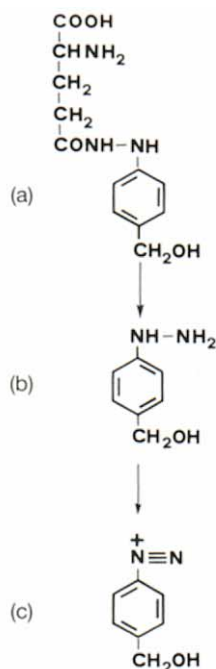


**Figura 04** - Representação das estruturas do basidiocarpo maduro.

A forma de obtenção dos extratos é uma variável bastante importante sobre os resultados de mutagenicidade e antimutagenicidade. Por exemplo, o cogumelo do deserto (*Tirmania pinoyi*) foi seqüencialmente extraído com água fervente, clorofórmio e etanol. No teste de AMES/*Salmonella* apenas o extrato de clorofórmio apresentou atividade mutagênica com e sem ativação metabólica. Já o extrato etílico foi capaz de inibir a atividade mutagênica de alguns carcinógenos (Hanna *et al.*, 1989).

Toth e Erickson (1986) demonstraram atividade carcinogênica no *Agaricus bisporus* (champignon) fresco *in vivo*. Dentre os compostos do *A. bisporus* que apresentam atividade mutagênica e/ou carcinogênica encontram-se o  $\beta$ -N-[ $\gamma$ -

L(+)-glutamil]-4-(hidroximetil)fenil-hidrazina (agaritina) e seus derivados (Fig. 05) (Shephard *et al.*, 1995).



**Figura 05** – Conversão da agaritina (a) presente em *Agaricus bisporus* em p-hidroximetilfenil-hidrazina (b) e o íon p-hidroximetilbenzeno-diazônio (c), com participação enzimática da  $\gamma$ -glutamilttransferase (Harris, 1986).

Dentre os cogumelos comestíveis e medicinais utilizados mundialmente encontramos o *Agaricus blazei* Murill, popularmente empregado no oriente como coadjuvante terapêutico de uma série de enfermidades. No Brasil, seu sabor peculiar não é muito apreciado, mesmo assim é utilizado na medicina popular.

#### 1.4.1 Cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murill)

O *Agaricus blazei* Murill (ABM), também conhecido como Cogumelo do Sol, Cogumelo de Deus e “Himematsutake” (Fig.06) é um cogumelo nativo do

interior do Estado de São Paulo, Brasil, especialmente na cidade de Piedade. O ABM foi descoberto pelo Dr. Takatoshi Furumoto, o qual observou que os habitantes daquela região eram estatisticamente mais saudáveis do que a média populacional, com uma baixíssima ocorrência de doenças geriátricas assim como uma baixa incidência de câncer. Posteriormente vários estudos realizados por pesquisadores, como o Dr. Shobo Shibata e Dr. Tetsuo Ikegawa revelaram algumas das atuais atividades farmacológicas presentes neste cogumelo.



**Figura 06** – Foto do *Agaricus blazei* Murill, basidiocarpo (J) jovem e (E) esporulado.

Segundo o pesquisador Marcos Francoti, em entrevista no Jornal da Tarde do dia 29 de junho de 1998, a finalidade terapêutica do ABM foi descrita há 121 anos, no Tratado Científico de Botânica Brasileira, de Joaquim Monteiro Caminhoá, que pertenceu à Faculdade de Zoologia e Botânica Médica do Rio de Janeiro. Somente depois de um século, amostras foram enviadas para o Instituto Iwade de Pesquisas no Japão. A grande quantidade de proteínas e vitaminas, entre outras substâncias importantes na manutenção da saúde, despertou a atenção de médicos e cientistas.

A revista Isto É (edição de 02 de julho de 1997), em artigo de responsabilidade de Gilberto Nascimento, intitulado “Cogumelos de fogo - *Fungo*

*brasileiro usado como afrodisíaco vira mania entre japoneses*”, informa que no Japão é muito difícil achar o ABM e que o preço é bem elevado. No Japão, o cogumelo brasileiro chega a custar US\$ 1.500 o quilo em períodos de escassez.

A produção em terras brasileiras chega a 15 toneladas ao ano, 70% da produção é exportada para o Japão, 20% para a colônia japonesa dos Estados Unidos e Canadá e 10% para a Coreia do Sul.

No Brasil as pesquisas são recentes, mas a procura do ABM tem aumentado, devido às notícias veiculadas pela imprensa japonesa em jornais, revistas e trabalhos científicos que chegam ao Brasil através de pessoas que consomem o produto no Japão, tanto em forma de chá como em cápsulas.

Há vários anos pesquisadores vem tentando cultivá-lo em escala comercial, mas somente de três a quatro anos para cá as tentativas alcançaram sucesso. Foram desenvolvidas técnicas de cultivo tanto a céu aberto como dentro de estufas. Atualmente o Cogumelo do Sol é cultivado tanto para exportação para o Japão, como para consumo interno, mercado este ainda pouco explorado, devido ao alto custo técnico de plantio.

Na literatura médica o ABM já foi citado em um caso clínico de regressão espontânea de carcinoma hepatocelular ocorrido com um homem de 69 anos de idade (Takeda *et al.*, 2000). Popularmente o ABM tem demonstrado uma efetiva colaboração no tratamento de: (i) diabetes, por reduzir os níveis de glicemia; (ii) câncer; (iii) hepatite; (iv) AIDS; (v) redução da pressão arterial e dos níveis de colesterol no sangue.

O basidiocarpo fresco do ABM é composto de 85-87% de água. Quando desidratado este demonstrou ser rico em proteínas (40 a 45%) e carboidratos (38-45%), além de possuir fibras alimentares (6-8%), lipídeos (3-4%) e

vitaminas, principalmente B1, B2 e niacina. Entre os lipídeos destacam-se o ergosterol (0,1-0,2% do peso seco) e o ácido linoléico (70-80% dos lipídeos totais) (Osaki *et al.*, 1994; Mizuno 1995). Chang *et al.* (2001) demonstraram que o ABM apresenta uma boa quantidade de componentes aromáticos não voláteis e entre os açúcares solúveis os mais comuns são o arabitol, a glucose e a triose.

O ABM é rico em polissacarídeos estimulantes do sistema imunológico, sendo o  $\beta$ 1,6-D Glucano (glucamanann) o principal polissacarídeo com esta atividade. Ohno *et al.* (2001) ao realizarem estudos enzimáticos e funcionais de extratos aquosos (quente, NaOH e NaOH quente) de ABM, demonstraram que o centro funcional do polissacarídeo  $\beta$ 1,6-glucano, é uma região rica em ligações  $\beta$ -1,3.

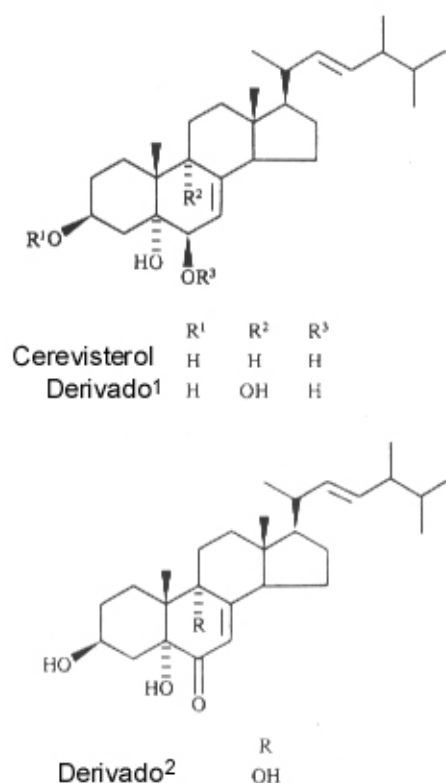
Extratos etílicos do basidiocarpo de ABM demonstraram atividade imunoestimulante sobre macrófagos, sendo observado um aumento na produção de RNAm de citocinas (IL-8 e TNF) e da óxido nítrico sintase (Sorimachi *et al.*, 2001a). Já extratos etílicos do micélio demonstraram redução dos efeitos citopáticos promovidos pelo vírus da encefalite eqüina ocidental (WEE) (Sorimachi *et al.*, 2001b).

O ABM também apresenta uma substância com atividade antimicrobiana, o ácido 13-hidroxi-cis-9, trans-11-octadienóico, obtido a partir do extrato hexânico de seu basidiocarpo (Osaki *et al.*, 1994).

Extratos obtidos de ABM com clorofórmio/metanol (2:1) apresentaram capacidade antitumoral contra tumores sólidos, sendo o ergosterol responsável por tal atividade. Embora não apresente atividade citotóxica contra as células tumorais, o ergosterol demonstrou ser hábil no bloqueio da angiogênese, promovendo morte das células tumorais ao impedir a neovascularização (Takaku *et al.*, 2001).

Quanto à toxicidade, observa-se a presença de esteróides citotóxicos derivados do cerevisterol e do ergosterol (Fig. 07). Estes esteróides foram isolados a partir de extratos do basidiocarpo do ABM obtidos com acetona e testados em células HeLa S<sub>3</sub> (células de hepatoma) (Kawagishi *et al.*, 1988). Em literatura o cerevisterol demonstrou efeito inibidor sobre as DNA polimerases de replicação, especialmente a DNA polimerase  $\alpha$  (Mizushina *et al.*, 1999). Outros derivados do ergosterol, tais como o 4-hidroxi-17-metil-incisterol (HMI), também apresentaram atividade inibidora sobre a DNA polimerase  $\alpha$ , além disto foi determinada dose dependência para esta resposta. O HMI inibiu o crescimento de células cancerígenas originadas de leucemia e tumores sólidos, o mesmo resultado foi observado em seus derivados sintéticos 17-metil-incisterol e 4-acetil-17-metil-incisterol (Togashi *et al.* 1998). Mizushina *et al.* (1998) sugerem que a ação inibidora sobre as DNA polimerases de replicação, está relacionada com a promoção de um bloqueio da divisão vegetativa do micélio, e conseqüente indução da produção do basidiocarpo.

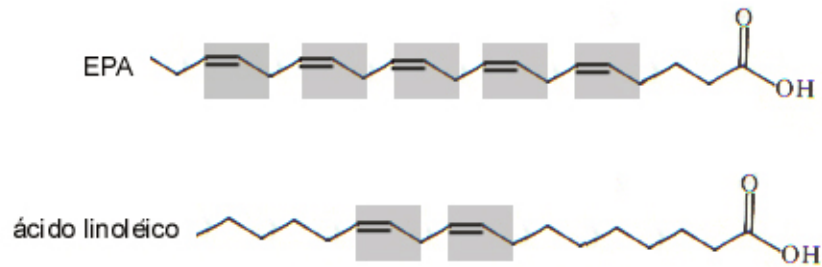
Com relação a antimutagenicidade do ABM, o ácido *cis*-9-12-octadecadienoico (ácido linoléico) (Fig. 08), obtido a partir dos extratos hexânico e clorofórmio/metanol(2:1), demonstrou atividade antimutagênica contra o benzopireno no teste de AMES/Salmonella (Osaki *et al.*, 1994).



**Figura 07** – Estrutura química do cerevisterol, de seu derivado<sup>1</sup> (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -tetrahidroxiergosta-7,22-dieno) e do derivado<sup>2</sup> do ergosterol (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -triidroxiergosta-7-22,dieno-6-ona) presentes no *Agaricus blazei* Murill.

Os ácidos graxos podem apresentar atividade desmutagênica e bioantimutagênica (Kuroda *et al.*, 2001). Sua atividade desmutagênica está relacionada com a captura de agentes mutagênicos nas micelas de lipídeos ou uma interação com mecanismos enzimáticos que inibem a ativação de promutágenos (Hayatsu *et al.*, 1988). Alguns ácidos graxos *cis* insaturados que apresentam o grupo carbonil  $\alpha$ -insaturado (ex.: ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA)) (Fig. 04), são capazes de interagir com grupos sulfidrila (-SH) de algumas DNA polimerases, promovendo mudanças estruturais que facilitam o processo de reconstrução do DNA (Sasaki *et al.*, 1994). Entre os ácidos graxos de C<sub>18</sub> a C<sub>24</sub> já analisados o inibidor mais fraco de DNA polimerases foi o ácido linoléico (AL), capaz de interagir, *in vitro*,

com um domínio de 8kDa da DNA polimerase  $\beta$  de mamíferos. (Mizushina *et al.*, 2000). É importante lembrar que a mesma DNA polimerase é fundamental no preenchimento das lacunas geradas pelo reparo por excisão, importantíssimo nas lesões promovidas por agentes alquilantes (Friedberg, 1984).



**Figura 08** – Comparação da estrutura química do ácido linoléico com o ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA). A área cinza aponta o grupo carbonil  $\alpha$ -insaturado.

Extratos aquosos de uma mistura de linhagens de ABM, produzidos em três temperaturas (gelado, ambiente e aquecido), também apresentaram atividade antimutagênica, contra a ciclofosfamida *in vivo* (Delmanto *et al.*, 2001) e contra o metilmetanosulfonato *in vitro* (Menoli *et al.*, 2001). Até o presente momento não há relatos de efeito mutagênico com este cogumelo.

## 2 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo do presente trabalho é investigar os efeitos mutagênicos e antimutagênicos do *Agaricus blazei* Murill linhagem AB97/11, através de extratos aquosos e orgânicos obtidos a partir do corpo de frutificação deste cogumelo. Para tal foram utilizados quatro testes muito utilizados na mutagênese (teste do Micronúcleo, do Cometa, de Aberrações cromossômicas e de Troca entre Cromátides Irmãs) em células de mamífero em cultura.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar, *in vitro* sobre células V79, a indução de Micronúcleos e Cometas por extratos aquosos dos basidiocarpos de *Agaricus blazei* Murill (ABM) linhagem AB97/11 na fase jovem e esporulada de desenvolvimento, obtidos em três temperaturas de extração (4, 21 e 60°C).

Investigar *in vitro*, sobre células V79, a redução na frequência de Micronúcleos e células com Cometas induzidos pelo agente metimetanosulfonato (MMS), por extratos aquosos dos basidiocarpos de ABM linhagem AB97/11 na fase jovem e esporulada de desenvolvimento, obtidos em três temperaturas de extração (4, 21 e 60°C).

Investigar diferenças nas respostas de mutagenicidade e antimutagenicidade, entre as fases de desenvolvimento do basidiocarpo de ABM, e entre as temperaturas de extração aquosa (4, 21 e 60°C).

Investigar efeito citotóxico, clastogênico e recombinogênico de extratos orgânicos (clorofórmio/metanol (3:1) e etanol) do basidiocarpo de ABM linhagem AB97/11, através de testes de Aberrações Cromossômicas (AC) e Trocas entre Cromátides Irmãs (TCI) *in vitro*, aplicados em células CHO-K<sub>1</sub>.

Investigar efeito anticlastogênico (concentração final 0,03, 0,06 e 0,09%) e anti-recombinogênico (concentração final) de extratos orgânicos (clorofórmio/metanol (3:1) e etanol) do basidiocarpo de ABM linhagem AB97/11, testados frente ao MMS, em tratamentos simultâneos contínuos, através de testes de AC e TCI *in vitro*, aplicados em células CHO-K<sub>1</sub>.

Investigar o envolvimento de mecanismos de reparo na atividade anticlastogênica dos extratos orgânicos (clorofórmio/metanol (3:1) e etanol) do basidiocarpo de ABM linhagem AB97/11, testados frente ao MMS, em tratamentos simultâneos contínuos, através do teste de AC aplicado em células deficientes em mecanismos de reparo (CHO-xrs5).

Investigar diferenças nas respostas biológicas entre o extrato de ABM obtido com etanol e com clorofórmio/metanol (3:1).

**3 ARTIGO 01**

Avaliação de extratos aquosos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill contra a  
atividade mutagênica do metilmetanosulfonato  
sobre células V79

REVISTA:

**CYTOLOGIA**

International Journal of Cytogenetics and Cell Biology

**TÍTULO:** Avaliação de extratos aquosos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill contra a atividade mutagênica do metilmetanosulfonato sobre células V79

**TÍTULO CORRIDO:** Avaliação de extratos de *A. blazei* Murrill em células V79

**AUTORES:** Luiz, R. C.<sup>1</sup>, Jordão, B. Q.<sup>1</sup>, da Eira, A. F.<sup>2</sup>, Ribeiro, L.R.<sup>3</sup>, e Mantovani, M. S.<sup>1,\*</sup>

**INSTITUIÇÕES:** <sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86.051-990 Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Produção Vegetal, Módulo de Cogumelos, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 18603-970 Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

**RODAPÉ:** \* Autor correspondente: Tel./fax: +55-43-3714207

e-mail: [biomsm@uel.br](mailto:biomsm@uel.br) (Dr. M. S. Mantovani)

## Resumo

Existem várias espécies de cogumelos utilizadas na medicina e na alimentação. O *Agaricus blazei* Murrill é uma espécie nativa do Brasil, muito consumida devido às suas propriedades medicinais. No presente trabalho a avaliação da atividade antimutagênica de extratos aquosos da linhagem AB97/11, na fase jovem e esporulada de desenvolvimento de seu basidiocarpo, foi realizada sobre células de hãmsster Chinês V79, utilizando-se o teste do micronúcleo e do cometa. As células foram tratadas na concentração de 0.15% de extratos aquosos preparados em temperaturas diferentes: (1) gelado (4°C); (2) ambiente (21°C); e (3) aquecido (60°C). Os extratos foram aplicados em protocolos de mutagenicidade e antimutagenicidade (simultâneo simples, pré-incubação e contínuo) contra o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS). Para ambos os testes empregados o tempo de tratamento foi de 1h. Os resultados demonstram que os extratos aquosos do *A. blazei* linhagem AB97/11 obtidos nas três fases, tanto na fase jovem, quanto na fase esporulada de desenvolvimento, não apresentam atividade antimutagênica contra o MMS em células V79 tanto no teste do Micronúcleo quanto no teste doCometa.

**Palavras-chave:** *Agaricus blazei* Murrill; Antimutagênese; Teste do Micronúcleo; Teste do Cometa; células V79; Metilmetanosulfonato

## Introdução

Nas últimas décadas, têm-se sugerido que o uso diário de antimutagênicos e anticarcinogênicos seja um modo efetivo de prevenção do câncer e doenças genéticas, sendo este procedimento é conhecido como quimioprevenção (Gomes *et al.* 1996; Surh *et al.* 1996). Muitas substâncias protetoras têm sido encontradas na dieta e os cogumelos, incluindo o *Agaricus blazei* Murill, ocupam lugar de destaque (Lohman *et al.* 2001). O *A. blazei* é um cogumelo comestível originário do sudeste brasileiro, conhecido no Japão como "himematsutake" ou "kawariharatake". Popularmente é utilizado como afrodisíaco e no combate de doenças, como stress, diabetes, perturbações gástricas, osteoporose e até mesmo o câncer.

Existe pouca informação a respeito da composição química deste cogumelo. Conhece-se a existência de uma substância antimicrobiana, o ácido 13-hidroxi cis-9, trans-11-octadienóico encontrado no extrato hexânico, e no extrato clorofórmio/metanol (2:1) foi identificado o ácido linoléico, que representa de 70 a 78% dos lipídeos totais encontrados no *A. blazei* e apresentou atividade antimutagênica contra o benzopireno no teste de Ames com *Salmonella* sp. (Osaki *et al.* 1994). Também já foram identificados polissacarídeos compostos de cadeias de D-glucose com ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 associados com atividade antitumoral. Estes compostos encontram-se na forma de complexo proteína-polissacarídeo, e atuam estimulando o sistema imunológico, especialmente as células NK e macrófagos (Itoh *et al.* 1994; Fujimiya *et al.* 1998; Fujimiya 1999). Mais recentemente outro polissacarídeo antitumoral foi isolado, o glucamannan, que apresenta cadeias D-glucose com ligações  $\beta$ -1,2 (Mizuno *et al.*, 1999).

Extratos aquosos de *A. blazei* já demonstraram efeito antimutagênico contra a ciclofosfamida no teste do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos

(Delmanto *et al.* 2001) e *in vitro* nos testes do micronúcleo e do cometa contra o metilmetanosulfonato (MMS) em células V79 (Menoli *et al.* 2001).

O presente trabalho avaliou extratos aquosos obtidos do corpo de frutificação (basidiocarpo) do *A. blazei* da linhagem AB97/11, em duas fases de desenvolvimento (jovem e esporulada), utilizando o teste do micronúcleo (MN) em células binucleadas e do cometa em células V79 sobre ação do MMS, buscando evidenciar a existência de substâncias com efeito mutagênico ou antimutagênico nestes extratos, assim como estudar possíveis diferenças nas respostas entre as duas fases de desenvolvimento do basidiocarpo.

## **Material e Métodos**

### **Preparação dos extratos aquosos**

Amostras de basidiocarpo seco e pulverizado da linhagem AB97/11 do *A. blazei*, na fase jovem e esporulada de desenvolvimento, produzidas no Módulo de Cogumelos do Departamento de Agronomia da UNESP, Botucatu, SP (Brasil). Após 10 min de agitação as soluções aquosas, obtidas pela diluição de 5g do pó de basidiocarpo em 200ml de água destilada, foram incubadas em três temperaturas diferentes: (a) gelado (4°) por 1h antes da filtração; (b) ambiente (21°C) por 2h antes da filtração; e aquecido (60°C) por 5 min e filtrados 15 min após resfriamento em temperatura ambiente. As soluções foram inicialmente filtradas em papel de filtro comum e posteriormente esterilizadas em filtro bacteriológico (Millipore). Alíquotas foram congeladas para uso posterior em temperatura ambiente. Cada extrato foi aplicado em culturas celulares na diluição final de 0,15% (300µl em 500ml de cultura).

### **Cultura e Tratamento celular**

As células V79 (fibroblasto de pulmão de hamster Chinês) fornecidas pelo Laboratório de Mutagênese da USP Ribeirão Preto (SP), foram cultivadas em frasco de cultura (25cm<sup>2</sup>), na forma de monocamada, em meio de cultura Ham's F10 (GibcoBRL) mais meio mínimo essencial Dulbecco's Eagle modificado (D-MEM GibcoBRL) (1:1), com 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL) a 37°C em incubadora do tipo BOD. Nestas condições o ciclo celular é de 12-14 h. Para ambos os testes as células foram cultivadas por dois ciclos celulares completos (25h) em meio de cultura completa antes de serem tratadas conforme um dos seguintes protocolos de tratamento: (1) cada extrato na concentração final 0,15% por 1h (mutagenicidade); (2) cada extrato na concentração final 0,15% co-tratado com MMS por 1h (simultâneo simples); (3) cada extrato na concentração final 0,15% incubado com o MMS por 1h e posteriormente aplicado em cultura por 1h (simultâneo com pré-incubação); (4) cada extrato na concentração final 0,15% co-tratado com MMS por 18h (simultâneo contínuo). Os protocolos incluíam: (a) uma cultura tratada com tampão fosfato salino PBS (pH 7,4) (controle negativo); e (b) uma cultura tratada com agente alquilante MMS nas concentrações finais  $4 \times 10^{-4}$ M para o teste do MN mutagenicidade, simultâneo simples e pré-incubação,  $1 \times 10^{-4}$ M para o teste do MN simultâneo contínuo e  $1,2 \times 10^{-4}$ M para o teste do cometa (controle positivo). O protocolo de mutagenicidade simultâneo contínuo não foi realizado no teste do cometa, pois esta técnica admite apenas tratamentos por períodos curtos de 1 a 3 horas, para que haja o envolvimento dos mecanismos de reparo celular. Para ambos os testes e todos os tratamentos foram realizadas 3 repetições independentes.

## **Produtos Químicos**

Como agente indutor de danos foi utilizado o agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS, CAS: 66-27-3, Aldrich), recentemente dissolvido em tampão fosfato salino livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS) pH 7,4. Foram utilizados diferentes concentrações de MMS conforme o protocolo de tratamento celular, cada concentração foi escolhida a partir de testes realizados em nosso laboratório, dados não demonstrados, tendo como critério de escolha a indução danos no DNA sem a promoção de citotoxicidade.

Para bloqueio da citocinese no teste de MN foi utilizada a Citocalasina-B (Cyt-B, CAS: 14930-96-2, Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, CAS: 67-68-5, Merck) para obtenção de solução estoque 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$  mantida a 4°C. Outros químicos principais utilizados foram: agarose de ponto de fusão normal (NMP): Roth, Karlsruhe, Germany; agarose de baixo ponto de fusão (LMP) (CAS: 9012-36-6): FMC, Rockland, MD; EDTA (CAS: 60-00-4): Sigma; e N-laurilsarcosinato de sódio (CAS: 7631-98-3).

## **Teste do Micronúcleo**

Os agentes foram adicionados a 5ml de meio de cultura, 25h após o início da cultura das células V79, que foram previamente semeadas em frascos de 25cm<sup>2</sup> (Nunc) contendo meio de cultura completo. Ao final dos tratamentos com limitação de tempo (mutagenicidade e antimutagenicidade simultâneo simples e pré-incubação) as células foram lavadas duas vezes com 5ml de PBS (pH 7,4) em temperatura ambiente e era adicionada Cyt-B ao meio de cultura novo, na concentração final de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . As células foram cultivadas por mais 17 horas para o bloqueio da citocinese e conseqüente produção das células binucleadas.

Para a coleta as células foram tripsinizadas (tripsina 0,025% temperatura ambiente), hipotonizadas (citrato de sódio 1%), fixadas com metanol/ácido acético (3:1) e coradas com

Giemsa 5% dissolvido em tampão fosfato (0,06M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,039M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) por 5 minutos e analisadas.

Foram analisadas 1000 células binucleadas por tratamento, para cada repetição experimental. Somente células com citoplasma conservado foram contabilizadas. Para identificação dos micronúcleos os seguintes critérios foram utilizados: (1) o MN devia ser menor que 1/3 do núcleo; (2) tanto MN quanto núcleo deviam ser arredondados; (3) o MN não poderia apresentar conexão com o núcleo; e (4) o MN não devia ser refringente e deve ter coloração semelhante ao núcleo (Schmid 1976; Titenko-Holland *et al.* 1997).

### **Teste do Cometa**

Foram utilizados procedimentos gerais para o teste do cometa com modificações propostas por Klaude *et al.* (1996) e modificações adicionais.

As células V79 foram semeadas em frascos (Nunc) com 2.5ml de meio de cultura completo, cultivadas por 25h e tratadas por 1h com cada agente, nos protocolos de mutagenicidade e antimutagenicidade simultâneo simples e com pré-incubação. Ao final do tratamento as células foram tripsinizadas (200µl de tripsina 0,025%), centrifugadas e ressuspensas em 500µl de meio de cultura após centrifugação. Foi misturado 10µl de suspensão celular com 120µl de agarose normal 5% a 37°C, a qual foi depositada sobre uma lâmina pré coberta com agarose LMP 1,5% e levadas para refrigeração 4 °C por 10min cobertas com lamínula. Após remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise, recentemente preparada, composta de 89ml solução (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10 corrigido com NaOH sólido, 890ml de água destilada e 1% de laurilsarcosinato de sódio), 1ml de Triton X-100 (Merck) e 10ml de DMSO. A lise celular ocorria em geladeira 4°C, protegida da luz, durante 1h. Em seguida as lâminas foram encaminhadas para a cuba de

eletroforese com tampão pH>13 (300mM NaOH e 1mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de NaOH 10N e EDTA 200mM pH10,0) a 4°C por 20 min para o desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada a 4°C por 20 min sob 25V e 300mA. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl) durante 3 ciclos de 5 min, secas e fixadas em álcool etílico 100% por 10 min e guardadas para leitura. Para coloração as lâminas foram cobertas com 50µl de brometo de etídio 20µg/ml e lamínula. O material foi avaliado em microscópio de fluorescência (Nikon) no aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

Foram analisadas visualmente (Kobayashi 1995) 100 células por tratamento, classificando os cometas em: (classe 0) células não danificadas que não apresentam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do núcleo; (classe 2) células com cauda de tamanho entre 1 a 2 X o diâmetro do núcleo; (classe 3) células com cauda maior que 2 X o diâmetro do núcleo. Células apoptóticas, que apresentam o núcleo totalmente fragmentado não foram contabilizadas (Hartmann e Speit 1997). O escore total foi calculado pela somatória da multiplicação de células observadas em cada classe de lesão a qual pertenciam (Speit e Hartmann 1999).

### **Análise estatística**

Para ambos os testes os resultados das três repetições independentes foram somados e as diferenças estatísticas em relação aos controles foram determinadas pelo teste do  $\chi^2$  (Pereira 1991). Para estimativa da porcentagem de redução foi utilizada a fórmula (Waters et al. 1990):

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{resultado do controle positivo} - \text{resultado do teste de anti-mutagenicidade})}{(\text{resultado do controle positivo} - \text{resultado do controle negativo})} \times 100$$

## Resultados

O resultado das três repetições do protocolo de mutagenicidade de 1h de tratamento com cada extrato de *A. blazei* está apresentado na Tabela 1 para o teste do MN e na Tabela 2 para o teste do cometa. Ambos os testes demonstraram ausência de diferença estatística significativa entre os extrator e o controle negativo, tanto em relação ao número de MN observados, quando ao total de células com lesão. O resultado demonstra que nas condições de tratamento utilizadas os extratos aquosos da fase jovem e esporulada de desenvolvimento do basidiocarpo da linhagem AB97/11 do *A. blazei*, não apresentam efeito mutagênico, independente da temperatura de extração do extrato.

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam, respectivamente, os resultados dos protocolos de antimutagenicidade simultâneo simples, com pré-incubação e contínuo no teste do MN. Em todos os casos os extratos não foram capazes de reduzir significativamente número de MN em relação ao controle positivo. No teste de antimutagenicidade simultâneo contínuo (Tabela 5), o extrato obtido a partir do basidiocarpo esporulado extraído em temperatura ambiente apresentou maior tendência protetora, sendo observada uma fraca redução (35,93%) da quantidade MN em relação ao controle positivo (MMS), o que não representa uma diferença estatística significativa.

Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados os resultados dos protocolos antimutagenicidade simultâneo simples e com pré-incubação no teste do cometa, onde não foi observada redução significativa, em relação ao MMS, no número de células com lesão no DNA, bem como dos escores, demonstrando que os extratos de *A. blazei* não apresentaram capacidade protetora, tanto em relação ao número de células com dano, quanto em relação à classe de danos observada. Estes resultados demonstram que independentemente da temperatura de extração os extratos aquosos, de ambas as fases de desenvolvimento da linhagem AB97/11, não possuem atividade protetora contra o MMS.

## Discussão

Raros são os dados biológicos a respeito dos efeitos associados aos cogumelos, especialmente no que diz respeito às atividades antimutagênica e anticarcinogênica (Grüter *et al.* 1990). Como o uso do *A. blazei* é muito popular e o modo de preparo de seu extrato é bastante variado, foram testadas três temperaturas de extração aquosa (4°, 21° e 60°C) e independente da temperatura utilizada nossos resultados demonstraram que na concentração de 0,15% os extratos aquosos da linhagem AB97/11 não apresentaram atividade mutagênica. Esta resposta biológica também não sofreu interferência da fase de desenvolvimento do basidiocarpo, sugerindo que tanto na fase jovem quanto na fase esporulada, não ocorre a produção significativa de substâncias mutagênicas hidrossolúveis (Tabelas 1 e 2).

Existem basicamente duas classes de substâncias protetoras sobre o DNA, as substâncias desmutagênicas e as bioantimutagênicas. Substâncias desmutagênicas são aquelas capazes de impedir a ação do agente mutagênico, principalmente por adsorção dos mesmos, portanto agem no exterior da célula. Agentes bioantimutagênicos são aqueles capazes de atuar na prevenção da lesão ou no reparo do DNA, agindo no interior da célula (Kada e Shimoi 1987). Na tentativa de elucidar os mecanismos de antimutagenicidade faz-se necessário o uso de protocolos de tratamento (De Flora 1998). Dos vários protocolos apenas um foi utilizado no presente estudo, o tratamento simultâneo com três variações (simples, pré-incubação e contínuo), que demonstram tanto capacidade desmutagênica quanto bio-antimutagênica.

Menoli *et al.* (2001) em tratamentos de 2 hr para o teste do MN e de 1h para o teste do cometa, observaram efeito protetor de extratos aquosos obtidos de uma mistura de linhagens de *A. blazei* (AB96/97, AB96/09 e AB97/11), em três temperaturas (gelado, ambiente e aquecido), mas no teste do cometa os resultados obtidos demonstraram uma atividade antimutagênica parcial, sendo observado efeito protetor em apenas algumas concentrações e

temperaturas de extratos no protocolo de pré-tratamento. Nossos resultados demonstram ausência completa de atividade antimutagênica dos extratos de *A. blazei* frente ao MMS (Tabelas 3, 4, 6 e 7), e que este resultado independe da temperatura de extração e da fase de desenvolvimento do basidiocarpo. O fator tempo de tratamento também pode ser descartado, pois não foi observado efeito protetor no tratamento simultâneo contínuo (Tabela 5).

Variações geográficas, climáticas e intra-específicas podem interferir na resposta biológica dos cogumelos (Chang 1996), este tipo de interferente precisa ser estudado com o *A. blazei*, pois pode alterar o efeito antimutagênico. Não é possível excluir a presença de atividade antimutagênica no *A. blazei*, pois pode estar ocorrendo uma extração incompleta dos componentes ativos conforme o tipo de solvente utilizado na extração, desta forma extratos orgânicos também devem ser avaliados. Além destes fatores, a forma de colheita e conservação deste cogumelo pode promover a perda ou degradação de compostos ativos e para o cogumelo do sol, é importante a determinação do tempo de vida útil do basidiocarpo após a sua colheita.

Ainda é prematura a indicação ou contra-indicação do *A. blazei* na quimioprevenção. É necessário um maior conhecimento da composição química deste cogumelo para estimar as vantagens ou desvantagens do uso do mesmo para consumo humano.

### **Agradecimentos**

Este trabalho recebeu apoio da FAPESP-SP e do CNPq, Brasil.

**Tabela 1:** Frequências de micronúcleos (MN) em células V79 para avaliação de mutagenicidade de extratos aquosos do basidiocarpo de *A. blazei* linhagem AB97/11 (ABM) em duas fases de desenvolvimento.

Tratamentos	MN em 3000 células binucleadas	
	Número total	$\mu \pm SD$
Controle	39	1,3 $\pm$ 1,00
MMS 4 x 10 <sup>-4</sup> M	103 <sup>a</sup>	3,43 $\pm$ 1,53
ABM Jovem 0,15%		
4°C	38 <sup>b</sup>	1,27 $\pm$ 0,58
21°C	38 <sup>b</sup>	1,27 $\pm$ 1,53
60°C	41 <sup>b</sup>	1,37 $\pm$ 1,53
ABM Esporulado 0,15%		
4°C	40 <sup>b</sup>	1,33 $\pm$ 1,53
21°C	41 <sup>b</sup>	1,33 $\pm$ 0,58
60°C	41 <sup>b</sup>	1,37 $\pm$ 1,15

Controle (PBS pH 7,4); MMS - metilmetanosulfonato 4 x 10<sup>-4</sup>M;  $\mu$  – média; SD – desvio padrão

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0,05)

**Tabela 2:** Avaliação da mutagenicidade dos extratos aquosos do basidiocarpo de *A. blazei* linhagem AB97/11 (ABM), em duas fases de desenvolvimento, através do teste do cometa em células V79.

Tratamento	Classe do Cometa				Scores	Total de células com lesão em 300 células analisadas
	0	1	2	3		
Controle	203	94	4	1	105	99
MMS 1,2 x 10 <sup>-4</sup> M	25	210	62	3	343 <sup>a</sup>	275 <sup>a</sup>
ABM Jovem 0,15%						
4°C	198	100	2	0	104 <sup>b</sup>	102 <sup>b</sup>
21°C	202	94	4	0	102 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>
60°C	202	94	3	1	103 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>
ABM Esporulado 0,15%						
4°C	198	101	1	0	108 <sup>b</sup>	102 <sup>b</sup>
21°C	202	97	1	0	99 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>
60°C	200	99	1	0	101 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>

Controle (PBS pH 7,4); MMS - metilmetanosulfonato 1,2 x 10<sup>-4</sup>M

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0,05)

**Tabela 3:** Frequências de micronúcleos (MN) em células V79 para avaliação de antimutagenicidade de extratos aquosos do basidiocarpo de *A. blazei* linhagem AB97/11 (ABM), em duas fases de desenvolvimento, no protocolo de antimutagenicidade simultâneo simples de 1h.

Tratamentos	MN em 3000 células analisadas	
	Número total	$\mu \pm SD$
Controle	40	1,33 $\pm$ 0,57
MMS 4 x 10 <sup>-4</sup> M	102 <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 2,00
ABM Jovem 0,15%		
4°C + MMS	101 <sup>b</sup>	3,37 $\pm$ 0,58
21°C + MMS	99 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 1,00
60°C + MMS	98 <sup>b</sup>	3,27 $\pm$ 1,78
ABM Esporulado 0,15%		
4°C + MMS	100 <sup>b</sup>	3,33 $\pm$ 1,53
21°C + MMS	99 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 1,00
60°C + MMS	96 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 1,00

Controle (PBS pH 7,4); MMS - metilmetanosulfonato 4 x 10<sup>-4</sup>M;  $\mu$  – média; SD – desvio de padrão  
<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0,05)

**Tabela 4:** Frequências de micronúcleos (MN) em células V79 para avaliação de antimutagenicidade de extratos aquosos do basidiocarpo de *A. blazei* linhagem AB97/11 (ABM), em duas fases, no protocolo de antimutagenicidade simultâneo de 1h com pré-incubação de 1h.

Tratamentos	MN em 3000 células binucleadas analisadas	
	Número total	$\mu \pm SD$
Controle	40	1,33 $\pm$ 1,15
MMS 4 x 10 <sup>-4</sup> M	104 <sup>a</sup>	3,47 $\pm$ 1,53
ABM Jovem 0,15%		
4°C + MMS	104 <sup>b</sup>	3,47 $\pm$ 1,15
21°C + MMS	102 <sup>b</sup>	3,4 $\pm$ 2,00
60°C + MMS	100 <sup>b</sup>	3,33 $\pm$ 1,53
ABM Esporulado 0,15%		
4°C + MMS	102 <sup>b</sup>	3,4 $\pm$ 1,00
21°C + MMS	100 <sup>b</sup>	3,33 $\pm$ 1,53
60°C + MMS	99 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 1,73

Controle (PBS pH 7,4); MMS - metilmetanosulfonato 4 x 10<sup>-4</sup>M;  $\mu$  – média; d.p. – desvio padrão

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0,05)

**Tabela 5:** Frequências de micronúcleos (MN) em células V79 para avaliação de antimutagenicidade de extratos aquosos do basidiocarpo de *A. blazei* linhagem AB97/11, em duas fases de desenvolvimento, no protocolo de antimutagenicidade simultâneo contínuo de 18h.

Tratamentos	MN	
	Número total	$\mu \pm SD$
Controle	44	1,47 $\pm$ 1,00
MMS 1 x 10 <sup>-4</sup> M	108 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 1,73
Basidiocarpo jovem 0,15%		
4°C + MMS	96 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,58
21°C + MMS	89 <sup>b</sup>	2,97 $\pm$ 1,53
60°C + MMS	98 <sup>b</sup>	3,27 $\pm$ 1,15
Basidiocarpo esporulado 0,15%		
4°C + MMS	101 <sup>b</sup>	3,57 $\pm$ 1,00
21°C + MMS	100 <sup>b</sup>	3,33 $\pm$ 1,53
60°C + MMS	93 <sup>b</sup>	3,1 $\pm$ 1,15

Controle (PBS pH 7,4); MMS=metilmetanosulfonato 1 x 10<sup>-4</sup>M

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0,05)

**Tabela 6:** Avaliação da antimutagenicidade de extratos aquosos do basidiocarpo de *A. blazei* linhagem AB97/11, em duas fases de desenvolvimento, através do teste do cometa em células V79 no protocolo de antimutagenicidade simultâneo simples de 1h.

Tratamento	Classe do Cometa				Scores	Total de células com lesão, para 300 células analisadas.
	0	1	2	3		
Controle	202	96	2		100	98
MMS 1,2 x 10 <sup>-4</sup> M	21	206	69	4	356 <sup>a</sup>	279 <sup>a</sup>
ABM Jovem 0,15%						
4°C + MMS	25	198	73	4	356 <sup>b</sup>	275 <sup>b</sup>
21°C + MMS	22	205	70	3	354 <sup>b</sup>	278 <sup>b</sup>
60°C + MMS	26	195	75	4	357 <sup>b</sup>	274 <sup>b</sup>
ABM Esporulado 0,15%						
4°C + MMS	23	204	71	2	352 <sup>b</sup>	277 <sup>b</sup>
21°C + MMS	24	198	74	4	358 <sup>b</sup>	276 <sup>b</sup>
60°C + MMS	22	206	69	3	353 <sup>b</sup>	278 <sup>b</sup>

Controle (PBS pH 7,4); MMS=metilmetanosulfonato 1,2 x 10<sup>-4</sup>M

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0,05)

**Tabela 7:** Avaliação da antimutagenicidade de extratos aquosos do *A. blazei* linhagem AB97/11, em duas fases de desenvolvimento, através do teste do cometa em células V79 no protocolo de antimutagenicidade simultâneo de 1h com pré-incubação de 1h.

Tratamento	Classe do Cometa				Scores	Total de células com lesão, para 300 células analisadas
	0	1	2	3		
Controle	204	87	8	1	106	97
MMS 1,2 x 10 <sup>-4</sup> M	27	201	67	5	350 <sup>a</sup>	275 <sup>a</sup>
ABM Jovem 0,15%						
4°C + MMS	28	194	76	3	354 <sup>b</sup>	273 <sup>b</sup>
21°C + MMS	27	204	64	5	346 <sup>b</sup>	273 <sup>b</sup>
60°C + MMS	30	192	75	3	351 <sup>b</sup>	270 <sup>b</sup>
ABM Esporulado 0,15%						
4°C + MMS	26	199	73	2	351 <sup>b</sup>	274 <sup>b</sup>
21°C + MMS	29	196	71	4	350 <sup>b</sup>	271 <sup>b</sup>
60°C + MMS	26	203	67	4	349 <sup>b</sup>	274 <sup>b</sup>

Controle (PBS pH 7,4); MMS=metilmetanosulfonato 1,2 x 10<sup>-4</sup>M

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0.05)

## Referências

- Chang, R. 1996. Functional Properties of Edible Mushrooms. *Nutrition Reviews* **54**: S91-S93.
- De Flora, S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res./Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **402**: 151-158.
- Delmanto, R. D., de Lima, P. L. A., Suguia, M. M., Salvadori, D. M. F., da Eira, A. F., Speit, G. e Ribeiro, L. R. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Res.* **20**: 15-21
- Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Katakura, R., e Ebina, T. 1999. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. *Anticancer Res.* **19**: 113-118.
- Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T. e Katakura, R. 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunology Immunotherapy* **46**: 147-159.
- Gomes, E. M., Soutot, P. R. F. e Felzenszwalb, I. 1996. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. *Mutation Res.* **367**: 203-208.
- Grüter, A., Friederich, U. e Würzler, F. E. 1990. Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutation Res.* **231**: 243-249.
- Hartmann, A. e Speit, G. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* **90**: 183-188.
- Itoh, H, Ito, H., Amano, H. e Noda, H. 1994. Inhibitory-action of a (1- $\beta$ )-D-glucan-protein complex (F-III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill (*himematsutake*) on meth-A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Japanese Journal of Pharmacology* **66**: 265-271.
- Kada, T. e Shimoi, K. 1987. Desmutagens and bio-antimutagens – Their modes of action. *BioEssays* **7**:113-115.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M. e Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* **3**: 103-115.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. e Ahnström, G. 1996. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutation Res.* **363**: 89-96.
- Lohman, P. H. M., Gentileb, J. M., Gentileb, G. e Fergusonc, L. R. 2001. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. *Mutation Res.* **496**: 1-4.

- Menoli, R. C. R. N., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Speit, G. e Jordão, B. Q. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Res.* **496**: 5-13.
- Mizuno M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. e Tsuchida, H. (1999) Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *Biochem. and Molec. Biology International* **47**: 707-714.
- Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J. e Miyazaki 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*. *Yakugaku-Zasshi* **114**:342-350.
- Pereira, A. A. B. 1991. Testes estatísticos para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, Rodrigues, M. A. L. R. e Monteleone-Neto, R. (eds.). *Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*, Rev. Brasil. de Genética, Ribeirão Preto, SP, pp. 113-121.
- Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In : Hollaender, A. (ed.). *Chemical Mutagens Vol.4*, Plenum Press, New York, pp. 31-53.
- Sternier, O., Bergman, R., Kesler, E., Magnusson, G., Nilsson, L., Wickberg, B. e Zimerson, E. 1982. Mutagens in larger fungi. I. Forty-eight species screened for mutagenic activity in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Res.* **101**: 269-281.
- Surh, Y. -J, Shlyankevich, M., Lee, J. W. e Yoo, J. -K. 1996. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo[a]pyrene by isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) cabamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. *Mutation Res.* **367**: 219-224.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A. M. e Smith, M. T. 1997. Genotoxicity of malathion on human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Res.* **338**: 85-95.
- Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F. e Brockman, H. E. 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Res.* **238**: 57-85.

**4 ARTIGO 02**

Antimutagenicidade de extratos orgânicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murill em células CHO selvagem (K<sub>1</sub>) e deficiente em reparo (xrs5) avaliada através do teste de Aberrações Cromossômicas e de Troca entre Cromátides Irmãs.

REVISTA:

FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY

**TÍTULO:** Antimutagenicidade de extratos orgânicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murill em células CHO selvagem (K<sub>1</sub>) e deficiente em reparo (xrs5) avaliada através do teste de Aberrações Cromossômicas e de Troca entre Cromátides Irmãs

**AUTORES:** Luiz, R. C.<sup>1</sup>, Jordão, B. Q.<sup>1</sup>, da Eira, A. F.<sup>2</sup>, Ribeiro, L. R.<sup>3</sup>, e Mantovani, M. S.<sup>1,\*</sup>

**INSTITUIÇÕES:** <sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86.051-990 Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Produção Vegetal, Módulo de Cogumelos, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 18603-970 Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

**RODAPÉ:** \* Autor correspondente: Tel. /fax: +55-43-3714207

e-mail: [biomsm@uel.br](mailto:biomsm@uel.br) (Dr. M. S. Mantovani)

## Resumo

O *Agaricus blazei* Murill é uma espécie de cogumelo medicinal nativa do Brasil. O presente trabalho realizou a avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos orgânicos da linhagem AB97/11, sobre células de hamster Chinês CHO-K<sub>1</sub> (selvagem) e CHO-xrs5 (deficiente em reparo), utilizando o teste de aberrações cromossômicas e o teste de trocas entre cromátides irmãs. As células foram submetidas a várias concentrações de extratos do basidiocarpo preparados a partir de etanol absoluto (EtOH) e clorofórmio/metanol (3:1) (C/MetOH). Estes extratos foram aplicados em tratamentos contínuos de 12h, tanto de mutagenicidade como de antimutagenicidade. O agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS  $1 \times 10^{-4}$ M) foi utilizado como agente indutor de danos. Nas condições experimentais utilizadas foi observado: (a) efeito citotóxico na concentração 0,83% do extrato C/MetOH; (b) efeito anticlastogênico nas concentrações 0,06 e 0,09% do extrato etílico e nas concentrações 0,03 e 0,06% do extrato C/MetOH; (c) ausência de efeito protetor em células CHO-xrs5 e; (d) ausência de efeito recombinogênico e antir-recombinogênico. Os resultados indicam que os extratos orgânicos do *A.blazei* linhagem AB97/11 apresentam atividade protetora do tipo bio-antimutagênica.

**Palavras-chave:** *Agaricus blazei* Murill; Teste de Aberrações Cromossômicas; Teste de Troca entre cromátides irmãs; células CHO; Metilmetanosulfonato.

## Introdução

A espécie brasileira de cogumelo, *Agaricus blazei* Murill (ABM), tem sido bastante destacada pelos meios de comunicação e pela comunidade científica. Conhecido como cogumelo do sol e “himematsutake”, é consumido pela população como alimento ou chá medicinal. Embora o ABM seja popularmente utilizado no combate de várias doenças, entre elas o câncer, sua composição química ainda não está completamente elucidada, desta forma vários extratos obtidos com diferentes solventes têm sido avaliados ao longo dos anos.

O fracionamento e análise de resíduos insolúveis em água obtidos a partir do basidiocarpo deste cogumelo, permitiram identificar uma atividade antitumoral neste cogumelo. Entre as frações, a mais ativa foi a FIII-2b, composta de um complexo de proteína e polissacarídeo  $\beta$ 1,6-glucano (Kawagishi et al., 1990). Utilizando oxalato de cálcio para extração, Takusaburo e Yoshiaky (1998) demonstraram a inibição do crescimento de células tumorais em camundongos. Ohno et al. (2001) após avaliarem enzimaticamente e funcionalmente extratos aquosos (aquecido, NaOH e NaOH aquecido) deste cogumelo, identificaram que o centro funcional do polissacarídeo  $\beta$ 1,6-glucano é uma região rica em ligações  $\beta$ -1,3.

A atividade imuno-estimulante, especialmente sobre os macrófagos, também foi observada com extratos etílicos do basidiocarpo, sendo demonstrado um aumento na produção de RNAm de citocinas (IL-8 e TNF) e da óxido nítrico sintase (Sorimachi et al., 2001a). A partir do micélio os extratos etílicos obtidos demonstraram redução dos efeitos citopáticos promovidos pelo vírus da encefalite eqüina ocidental (WEE) (Sorimachi et al., 2001b).

Os extratos aquosos também foram avaliados quanto a sua potencialidade de proteção do material genético. Extratos aquosos obtidos de uma mistura de linhagens de ABM, produzidos em três temperaturas (gelado, ambiente e aquecido), apresentaram atividade

antimutagênica contra a ciclofosfamida *in vivo* (Delmanto et al., 2001) e contra o metilmetanosulfonato *in vitro* (Menoli et al., 2001).

O uso de solventes mais apolares como o clorofórmio/metanol (2:1) permitiu identificar uma das substâncias envolvidas na atividade antitumoral contra tumores sólidos, o ergosterol. Esta substância atuou como potente bloqueador da angiogênese tumoral (Takaku et al., 2001). Osaki et al. (1994) ao utilizarem o mesmo solvente detectaram a presença de ácido linoléico, apresentou uma substância antimutagênica contra o benzopireno no teste de AMES/*Salmonella*. Enquanto o extrato obtido com hexano, além do ácido linoléico, apresentou uma substância com atividade antimicrobiana, o ácido 13-hidroxi-cis-9, trans-11-octadienóico. Extratos obtidos com acetona apontaram para citotoxicidade de esteróides derivados do ergosterol e do cerevisterol em células Hela S<sub>3</sub> (células de hepatoma) (Kawagishi et al., 1988).

O presente trabalho apresenta o estudo do potencial antimutagênico de extratos do basidiocarpo de ABM linhagem AB97/11, obtidos com etanol absoluto e clorofórmio/metanol (3:1), buscando identificar o mecanismo de ação envolvido ao utilizar uma linhagem celular selvagem (CHO-K<sub>1</sub>) e uma linhagem deficiente em reparo (CHO-xrs5).

## Material e Métodos

### Preparação dos extratos orgânicos

A partir de amostras de basidiocarpo desidratado e moído da linhagem AB97/11 do ABM, obtidas a partir do Módulo de Cogumelos do Departamento de Agronomia da UNESP, Botucatu, SP (Brasil), foram preparados extratos orgânicos com os solventes etanol absoluto (EtOH) e clorofórmio/metanol (3:1) (C/MetOH). Os extratos foram preparados através da dissolução de 7,5g de pó de basidiocarpo em 150ml do solvente. A suspensão foi encaminhada para agitação por 5 horas. Terminado o primeiro ciclo de extração o conteúdo foi filtrado em papel de filtro duplo, reservando o solvente, e o pó foi novamente suspenso em 150ml de solvente novo e encaminhado para agitação por mais 5 horas. Terminado o segundo ciclo a suspensão foi filtrada e os 300ml de extrato foram encaminhados para evaporação. Os solventes foram totalmente evaporados utilizando um sistema a vácuo, com agitação e aquecimento à 50°C. Posteriormente os resíduos foram suspensos em 5ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em 145ml de tampão fosfato salino livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS) pH 7,4. Os extratos foram alíquotados em frascos de crio-congelamento e descongelados conforme o uso. Para teste prévio de avaliação da citotoxicidade em células CHO-K<sub>1</sub>, os extratos foram aplicados em cultura na diluição final de 0,11, 0,21, 0,42 e 0,83%. Para os tratamentos no teste de aberração cromossômica (AC) em CHO-K1 foram utilizadas as concentrações finais 0,03, 0,06 e 0,09% dos extratos. No teste de AC em CHO-xrs5 e no teste de troca entre cromátides irmãs com CHO-K1, somente a concentração 0,06% foi utilizada.

## **Cultura e Tratamento celular**

Células de ovário de hamster Chinês (CHO) do tipo selvagem (K<sub>1</sub>) e deficientes no mecanismo de reparo de fita dupla de DNA (xrs5), fornecidas pelo Laboratório de Mutagênese das USP Ribeirão Preto (SP), foram cultivadas em frascos de cultura (25cm<sup>2</sup>), na forma de monocamada, em meio de cultura Ham's F10 (GibcoBRL) acrescido de meio mínimo essencial Dulbecco's Eagle modificado (D-MEM GibcoBRL) (1:1) com 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL) a 37°C em incubadora do tipo BOD. Nestas condições o ciclo celular destas células é de 12h. Para ambos os testes utilizados as células foram cultivadas por um ciclo celular completo (12h) antes de serem tratadas conforme o protocolo. Foram utilizados protocolos de mutagenicidade e antimutagenicidade. Todos os protocolos foram compostos de: (a) controle negativo (PBS pH 7,4 + DMSO); (b) controle positivo (metilmetanosulfonato (MMS) + DMSO); (c) tratamentos com os extratos EtOH e C/MetOH. No protocolo de mutagenicidade as células foram tratadas apenas com os extratos em suas diversas concentrações e no protocolo de antimutagenicidade as células recebiam tratamento simultâneo de extratos e MMS. Todos os tratamentos forma contínuos por 12h. A concentração de DMSO nos controles foi sempre equivalente à concentração final de DMSO do tratamento mais concentrado com extratos. Para ambos os testes e todos os tratamentos foram realizadas 3 repetições independentes, com exceção da avaliação da citotoxicidade em diversas concentrações realizado com uma repetição.

### **Agente Indutor de danos**

Para obtenção das aberrações cromossômicas estruturais e indução de trocas entre cromátides irmãs, foi utilizado o agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS, CAS: 66-27-3, Aldrich), recentemente dissolvido em tampão fosfato salino livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS) pH 7,4. Para todos os teste a concentração final deste agente em cultura foi de  $1 \times 10^{-4}$  M.

### **Aberrações cromossômicas**

Após tratadas, as células CHO-K<sub>1</sub> e CHO-xrs5 foram mantidas em cultura por 12h. Colcemide (Demecolcine, Sigma) (0,1µg/ml) foi adicionado 1h antes da colheita. Para obtenção das metáfases foi utilizada técnica de Moorhead et al. (1960) com modificações. Uma vez tripsinizadas as células foram hipotonizadas por 20min em solução citrato de sódio 1%, com agitação a cada 5min. Após fixação com metanol/ácido acético (3:1) as células foram depositadas em lâminas e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. Para detecção do índice mitótico foram contados os números de metáfases em 1000 células. Para avaliação das aberrações cromossômicas estruturais, foram analisadas 100 metáfases bem espalhadas contendo  $21 \pm 1$  cromossomos. Foram registradas quebras cromatídicas e isocromatídicas, além de anel cromossômico (r), rearranjos complexos (cr) e figuras trirradiais (tr) e quadrirradiais (qd).

### **Troca entre cromátides irmãs**

Células CHO-K<sub>1</sub> foram cultivadas por 36h com 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (Sigma) (74µg/ml) na ausência de luz. Nas últimas 12h as células foram tratadas e mantidas em cultura. Foi adicionado colcemide (0,1µg/ml) 1h antes da colheita. A visualização das

SCEs foi realizada segundo a técnica de fluorescência mais Giemsa de Perry e Wolf (1974), com modificações. As lâminas foram cobertas com Hoechst 33258 (Sigma) (800µg/ml) e expostas à luz branca overnight. Após remoção do Hoechst com água destilada, as lâminas foram mergulhadas por 30 segundos em solução de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1M pH 8,3 aquecido à 89°C e finalmente coradas com Giemsa 5% por 10min. Por tratamento foram analisadas 50 metáfases com 21±1 cromossomos em boas condições de coloração.

### **Análise Estatística**

Para ambos os testes os resultados foram analisados pelo teste t de Student. Nos tratamentos de mutagenicidade os dados obtidos com os extratos foram comparados com o controle negativo e nos tratamentos de antimutagenicidade foram comparados com o controle positivo. Para estimativa do índice mitótico (IM) foi utilizada a fórmula (Swierenga et al., 1991):

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Para estimativa da porcentagem de redução foi utilizada a fórmula (Waters et al., 1990):

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{resultado do controle positivo} - \text{resultado do teste de antimutagenicidade})}{(\text{resultado do controle positivo} - \text{resultado do controle negativo})} \times 100$$

## **Resultados**

### **Avaliação de citotoxicidade**

A Tabela 01 apresenta os resultados obtidos da avaliação de citotoxicidade dos extratos orgânicos do *Agaricus blazei* Murill (ABM) linhagem AB97/11, em tratamento contínuo de 12h sobre células CHO-K<sub>1</sub>. Com o aumento da concentração do extrato C/MetOH foi observada uma redução gradativa, dos índices mitóticos (IM), mas apenas a concentração 0,83% do extrato C/MetOH reduziu de forma estatisticamente significativa o IM, em relação ao controle. Nas concentrações utilizadas (0,11, 0,22, 0,42 e 0,83%) as reduções do IM obtidas com o extrato EtOH, não foram significativas. Como foi observada uma pequena redução no índice mitótico na concentração 0,11% do extrato C/MetOH, foram escolhidas as concentrações 0,03, 0,06 e 0,09% de ambos os extratos para realização do teste de aberração cromossômica em CHO-K<sub>1</sub>.

### **Avaliação de efeito clastogênico e anticlastogênico em CHO-K<sub>1</sub>**

A Tabela 02 demonstra os resultados de clastogenicidade e anticlastogenicidade obtidos com os extratos EtOH e C/MetOH do ABM linhagem AB97/11 em células CHO-K<sub>1</sub>. O metilmetanosulfonato (MMS) ( $1 \times 10^{-4}$ M) apresentou uma resposta positiva clara de sua capacidade clastogênica ao promover, principalmente, quebras cromatídicas, o que concorda com o seu mecanismo de lesão dependente da fase S do ciclo celular (Garcia et al., 2001). A concentração utilizada de MMS não interferiu no índice mitótico (4,2% contra 4,1% do controle negativo), tornando o controle positivo um ótimo parâmetro para comparação dos resultados obtidos com os extratos.

Ambos os extratos não apresentaram efeito clastogênico nas concentrações utilizadas, pois o total de metáfases aberrantes encontradas não diferiu significativamente do controle negativo (Tabela 02). Na Tabela 02 também podemos identificar um efeito antimutagênico dos extratos. Nas concentrações 0,06 e 0,09% o extrato EtOH apresentou efeito protetor

contra o MMS, com reduções significativas do total de metáfases com lesão em relação ao controle positivo. Um efeito protetor também foi observado com o extrato C/MetOH nas concentrações 0,03 e 0,06%. Ambos os extratos foram capazes de reduzir tanto lesões cromatídicas, quanto isocromatídicas. Rearranjos cromossômicos ainda puderam ser observados, porém em menor número. Como em ambos os extratos a concentração 0,06% apresentou efeito anticlastogênico, esta concentração foi escolhida para realização de testes de aberração cromossômica em células CHO-xrs5 e troca entre cromátides irmãs em células CHO-K<sub>1</sub>.

#### **Avaliação de efeito clastogênico e anticlastogênico em CHO-xrs5**

A Tabela 03 demonstra os resultados de clastogenicidade e anticlastogenicidade obtidos com os extratos EtOH e C/MetOH do ABM linhagem AB97/11 em células CHO-xrs5. A linhagem CHO-xrs5 apresentou uma frequência basal de metáfases aberrantes (26 metáfases em 300 analisadas) superior à frequência basal observada com células CHO-K<sub>1</sub> (12 metáfases) (Tabela 02). Esta diferença também foi evidente nos resultados do controle positivo, onde a quantidade de metáfases aberrantes induzidas pelo MMS é superior (82 metáfases) à quantidade observada com a CHO-K<sub>1</sub> (51 metáfases) (Tabela 02). Ambos os extratos não apresentaram efeito clastogênico. Ambos os extratos não apresentaram efeito antimutagênico nesta linhagem celular.

#### **Avaliação do efeito recombinogênico e anti-recombinogênico**

A Tabela 04 apresenta os resultados do teste de troca entre cromátides irmãs (SCE) dos extratos orgânicos do ABM linhagem AB97/11 realizado em células CHO-K<sub>1</sub>. O controle negativo aponta os níveis basais de trocas (2685 trocas em 150 metáfases analisadas). O controle positivo evidencia a capacidade de indução de SCEs, promovida pelo MMS (4056 trocas), como a maioria dos agentes S dependentes o MMS pode ser considerado um bom

indutor de trocas (Littlefield, 1982). Ambos os extratos promoveram um ligeiro aumento do número de SCEs (EtOH 2763 e C/MetOH 2861 trocas), em relação ao controle negativo, no entanto este aumento é estatisticamente não significativo. Os extratos também não foram efetivos na redução do número de trocas induzidas, pois a quantidade de trocas observadas no tratamento simultâneo com MMS (EtOH 3840 e C/MetOH 3781 trocas) não diferiu estatisticamente do controle positivo, portanto não foi observado efeito anti-recombinogênico.

## **Discussão**

A composição química do *Agaricus blazei* Murill (ABM) e suas atividades biológicas são o alvo principal de diversas pesquisas. O presente trabalho sugere a participação de algumas substâncias identificadas no ABM nos efeitos biológicos encontrados com os extratos orgânicos deste cogumelo, mas não descarta a possibilidade da existência de outras substâncias, que isoladamente ou em conjunto são responsáveis por estes efeitos.

O extrato C/MetOH na concentração 0,83% (Tabela 01), apresentou efeito citotóxico sobre células CHO-K<sub>1</sub> e tal atividade parece estar relacionada com a presença de esteróides citotóxicos neste extrato, pois comparado com o etanol, o clorofórmio é um solvente orgânico mais apolar, sendo capaz de extrair mais eficientemente substâncias menos polares como esteróides. Alguns dos esteróides presentes no ABM podem ser responsáveis por esta atividade, o esteróide 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -tetrahidroxi ergosta-7,22-dieno, derivado do cerevisterol, e a 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -triidroxi ergosta-7-22,dieno-6-ona, derivada do ergosterol (Kawagishi et al., 1988). O cerevisterol (Mizushina et al., 1999) e derivados do ergosterol (Togashi et al., 1998) têm demonstrado efeito inibidor sobre as DNA polimerases de replicação, especialmente a DNA polimerase  $\alpha$  e alguns destes derivados, como o 4-hidroxi-17-metil-incisterol (HMI), apresentaram capacidade de reduzir o crescimento de células cancerígenas. A inibição das DNA polimerases pode ser um dos fatores responsáveis pela desaceleração do ciclo celular, produzindo uma redução nos índices mitóticos das células CHO-K<sub>1</sub> em fase exponencial de

crescimento. Mizushina et al. (1998) sugeriram que substâncias com atividade inibidora sobre as DNA polimerases em replicação, agem como hormônios nos fungos induzindo a diferenciação do micélio em basidiocarpo, ao inibir a divisão vegetativa das hifas.

Assim como os extratos aquosos (Menoli et al., 2001), os extratos orgânicos do ABM não apresentaram qualquer efeito mutagênico, pois não foi observado efeito clastogênico sobre células CHO-K<sub>1</sub> e CHO-xrs5 (Tabela 02 e 03), e também não foi observado efeito recombinogênico (Tabela 04). Embora mais experimentos sejam necessários, principalmente testes *in vivo*, estes dados contribuem para a avaliação da segurança quanto ao consumo humano deste cogumelo.

Ambos os extratos apresentaram capacidade protetora contra o metilmetanosulfonato em células CHO-K<sub>1</sub> (Tabela 02 e 03), uma atividade antimutagênica em função da concentração utilizada, mas sem correlação dose-resposta. Substâncias com atividade protetora podem ser classificadas como desmutagênicas e bio-antimutagênicas (Kada et al., 1982). A ausência de efeito antimutagênico em células CHO-xrs5 deficiente em reparo (Tabela 03) sugere que os extratos apresentam atividade bio-antimutagênica. Substâncias bio-antimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA; ou (ii) estimulando o reparo livre de erro em danos no DNA; ou (iii) inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro (De Flora, 1998).

As células CHO-xrs5 apresentam deficiência na reunião de quebra de fitas duplas, por não produção da proteína Ku80, envolvida no reparo NHEJ (“non homologous end joining”) (Johnston et al., 1998). Células mutantes deficientes em reparo de fita dupla são suscetíveis à radiação X, mas apresentam sensibilidade cruzada com a bleomicina e com agentes alquilantes. Nossos resultados concordam com estudos citogenéticos que demonstram que estas linhagens celulares apresentam uma maior quantidade de aberrações cromossômicas espontâneas e que as freqüências de aberrações induzidas por agentes, como o

metilmetanosulfonato é bem maior quando comparada com as linhagens selvagens, principalmente na frequência de aberrações cromatídicas (Stopper et al., 1997). A ausência de efeito protetor dos extratos em célula CHO-xrs5 (Tabela 3) além de sugerir atividade bioantimutagênica, aponta que o mecanismo de proteção envolve, de alguma forma, um dos passos pertencentes ao reparo de fita dupla de DNA.

Entre as substâncias presentes no ABM, apenas o ácido linoléico, já foi estudado isoladamente em relação à capacidade antimutagênica (Osaki et al., 1994). O ácido linoléico (ácido *cis*-9-12-octadecadienoico) pertence ao grupo dos ácidos graxos *cis* insaturados, portadoras do grupo  $\alpha$ -carbonil insaturado. Alguns destes compostos como o ácido *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA), apresentaram capacidade de interagir com grupos sulfidrila (-SH) de algumas DNA polimerases, promovendo mudanças estruturais que facilitam o processo de reconstrução do DNA (Sasaki et al., 1994). Entre os ácidos graxos de C<sub>18</sub> a C<sub>24</sub> já analisados o inibidor mais fraco de DNA polimerases foi o ácido linoléico C<sub>18</sub>, capaz de interagir, *in vitro*, com um domínio de 8kDa da DNA polimerase  $\beta$  de mamíferos (Mizushina et al., 2000), atuando no acoplamento desta enzima com o primer.

Sendo a DNA polimerase  $\beta$  uma peça fundamental no preenchimento das lacunas geradas pelo reparo por excisão, mecanismo de reparo de fita simples mais importante contra os agentes alquilantes (Friedberg, 1984), o estímulo produzido pelo ácido linoléico pode ser uma das explicações plausíveis para a redução das lesões no DNA observada em células CHO-K<sub>1</sub> no presente trabalho (Tabela 02). A ausência de efeito protetor na concentração 0,09% do extrato C/MetOH pode ser originada de uma extração mais efetiva de ácidos graxos de maior peso molecular pelo clorofórmio, os quais poderiam competir com o ácido linoléico pelo acoplamento com a DNA polimerases. No entanto esta atividade do ácido linoléico sobre a DNA polimerase  $\beta$  não impede, isoladamente, a recombinação, por isto não pudemos observar proteção contra a indução de trocas entre cromátides irmãs (Tabela 04). Contudo, o

envolvimento deste mecanismo com o reparo de fita dupla de DNA no qual as células CHO-xrs5 apresentam deficiência, ainda necessita de maiores investigações.

Os agentes alquilantes monofuncionais são capazes de gerar indiretamente quebras de fitas duplas de duas formas: (i) por bloqueio da replicação do DNA pela presença da base nitrogenada alquilada e; (ii) por alquilação de bases nitrogenadas próximas em fitas opostas. Ao ocorrer quebra de fita dupla de DNA (Lewin, 2000) dois mecanismos podem entrar em ação: (a) reunião de terminais não homólogos (NHEJ), onde as proteínas Ku70 e Ku80 formam um dímero que estabiliza os terminais livres da dupla fita e convocam quinases DNA dependentes (DNA-PKs), DNA ligase IV e a proteína XRCC4; (b) reparo por recombinação, que envolve troca entre fitas de DNA e a participação da DNA polimerase  $\beta$  no preenchimento final de lacunas geradas. Ainda não foi comprovada a existência do reparo por recombinação em mamíferos, porém resultados indiretos têm sugerido sua existência. Nossos resultados apontam falta de efeito protetor dos extratos sobre a CHO-xrs5, desta forma a ausência da Ku80 impediria a estabilização da dupla fita de DNA, o que impediu o funcionamento do reparo por recombinação e cancelaria o mecanismo protetor gerado pelo ácido linoléico, pois a participação da DNA polimerase  $\beta$  no reparo por recombinação é posterior à estabilização da dupla fita de DNA.

São necessários estudos bioquímicos dos esteróides presentes no ABM para comprovação de sua capacidade inibidora das DNA polimerases de replicação, pois substâncias com tal atividade são de suma importância na descoberta de novos medicamentos para o tratamento de tumores.

Os mecanismos de reparo ainda precisam ser plenamente esclarecidos. Há a necessidade de se entender o real papel dos ácidos graxos sobre as DNA polimerases, além de comprovar a existência do mecanismo de reparo por recombinação em células de mamíferos, bem como elucidar a participação da Ku80 neste processo. Como os mecanismos de

antimutagênese deste cogumelo não estão esclarecidos e dependem de mais investigações a indicação do *A. blazei* Murill na quimioprevenção é prematura.

### Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio da FAPESP-SP, Brasil e do CNPq, Brasil.

**Tabela 01:** Avaliação da citotoxicidade dos extratos orgânicos de *Agaricus blazei* Murill linhagem AB97/11 em 1000 células CHO-K1.

Tratamento	Concentração (%)	ÍM
Controle		4,1
MMS		4,2
EtOH	0,11%	4,0
	0,22%	4,1
	0,42%	4,3
	0,83%	3,7
C/MetOH	0,11%	3,0
	0,22%	3,0
	0,42%	2,7
	0,83%	1,3 *

Controle (PBS + DMSO); MMS=metilmetanosulfonato  $1 \times 10^{-4}M$

EtOH= extrato obtido com etanol absoluto;

C/MetOH= extrato obtido com clorofórmio/metanol (3:1)

\* diferença significativa em relação ao controle negativo

**Tabela 02:** Avaliação da clastogenicidade e anticlastogenicidade de extratos orgânicos de *Agaricus blazei* Murrill linhagem AB97/11 em 300 metáfases de células CHO-K<sub>1</sub> submetidas ao teste de aberrações cromossômicas com tratamento contínuo de 12 horas.

Tratamento	Total de Metáfases Aberrantes	Aberrações por célula	Total de aberrações	Distribuição das aberrações						Redução (%)	IM	
				ic	ct	qd	tr	r	cr			
Control e	12	1,08	13	6	6	1	0	0	0		3,93	
MMS	51*	1,12	57	12	30	7	5	3	0		3,87	
EtOH	0,03%	14 <sup>a</sup>	1	14	3	7	1	1	2	0	3,87	
	0,06%	10 <sup>a</sup>	1,1	11	4	6	1	0	0	0	3,83	
	0,09%	13 <sup>a</sup>	1	13	5	7	1	0	0	0	3,67	
	0,03% + MMS	38 <sup>b</sup>	1,13	43	8	23	5	6	1	0	33,33	3,93
	0,06% + MMS	33 <sup>c</sup>	1,03	34	9	16	4	3	1	1	46,15	3,73
	0,09% + MMS	27 <sup>c</sup>	1,07	29	6	16	2	4	1	0	61,54	3,83
C/MetOH	0,03%	10 <sup>a</sup>	1,1	11	5	5	1	0	0	0	3,83	
	0,06%	9 <sup>a</sup>	1	9	4	4	1	0	0	0	3,87	
	0,09%	13 <sup>a</sup>	1	13	4	6	3	0	0	0	3,83	
	0,03% + MMS	30 <sup>c</sup>	1	30	9	16	2	3	0	0	53,84	4,07
	0,06% + MMS	29 <sup>c</sup>	1,10	32	9	17	1	4	0	1	56,41	3,93
	0,09% + MMS	39 <sup>b</sup>	1,10	43	14	19	5	5	1	1	30,77	3,6

Controle (PBS + DMSO); MMS= metilmetanosulfonato  $1 \times 10^{-4}$ M; ic – *quebra isocromatídica*; ct – *quebra cromatídica*; qd – *rearranjo quadrirradial*; tr – *rearranjo trirradial*; cr – *rearranjo complexo*; I.M. *índice mitótico*; EtOH – extrato obtido com etanol; C/MetOH= extrato obtido com clorofórmio/metanol (3:1).

\* Diferença estatística significativa em relação ao controle.

\*\* Diferença estatística significativa em relação ao controle MMS.

Aberrações por célula= total de aberrações/total de metáfases aberrantes

**Tabela 03:** Avaliação da clastogenicidade e anticlastogenicidade de extratos orgânicos de *Agaricus blazei* Murrill linhagem AB97/11 em 300 metáfases de células CHO-xrs5, submetidas ao teste de aberrações cromossômicas com tratamento contínuo de 12 horas.

Tratamento	Total de Metáfases Aberrantes	Aberrações por célula	Total de aberrações	Distribuição das aberrações						I.M.
				QCM	ic	ct.	qd	tr	r	
Controle	26	1	26	6	14	3	2	1	0	3,6
MMS	82*	1,23	101	13	81	4	2	1	0	3,5
EtOH	0,06%	28 <sup>a</sup>	30	5	20	3	2	0	0	3,4
	0,06% + MMS	81 <sup>b</sup>	94	12	74	1	2	3	0	3,4
C/MetOH	0,06%	34 <sup>a</sup>	39	7	28	4	0	0	0	3,3
	0,06% + MMS	91 <sup>b</sup>	112	14	94	1	1	2	0	3,3

Controle (PBS + DMSO); MMS= metilmetanosulfonato  $1 \times 10^{-4}$ M; ic – *quebra isocromatídica*; ct – *quebra cromatídica*; qd – *rearranjo quadrirradial*; tr – *rearranjo trirradial*; cr – *rearranjo complexo*; I.M. – *índice mitótico*; EtOH – extrato obtido com etanol absoluto; C/MetOH= extrato obtido com clorofórmio/metanol (3:1).

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Aberrações por célula= total de aberrações/total de metáfases aberrantes

**Tabela 04:** Avaliação da recombinogenicidade e antirecombinogenicidade de extratos orgânicos de *Agaricus blazei* Murrill linhagem AB97/11 em 150 metáfases analisáveis de células CHO-K<sub>1</sub>, submetidas ao teste de troca entre cromátides irmãs em tratamento contínuo de 12 horas.

Tratamento		Número total de trocas	Média de troca por célula ± SD
Controle		2685	17,9 ± 6,25
MMS 1x10 <sup>-4</sup> M		4056*	27,0 ± 6,5
EtOH	0,06%	2763 <sup>a</sup>	18,42 ± 5,64
	0,06% + MMS	3849 <sup>b</sup>	25,66 ± 6,21
C/MetOH	0,06%	2861 <sup>a</sup>	19,07 ± 6,25
	0,06% + MMS	3781 <sup>b</sup>	25,2 ± 5,94

Controle (PSB + DMSO); MMS - metilmetanosulfonato 1x10<sup>-4</sup>M; EtOH – extrato obtido com etanol absoluto; C/MetOH= extrato com clorofórmio/metanol (3:1); SD – desvio padrão

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

## Referências

- De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 402, 151-158.
- Delmanto, R.D., De Lima, P.L.A., Suguia, M.M., Salvadori, D.M.F., Da Eira, A.F., Speit, G. e Ribeiro, L.R., 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Res.* 20, 15-21.
- Friedberg, E., 1984. DNA Repair. W. H. Freeman and Company. New York press, New York, v.1 e 2.
- Garcia, C.L., Carloni, M., de la Peña, N.P., Fonti, E. e Palitti, F., 2001. Detection of DNA primary damage by premature chromosome condensation in human peripheral blood lymphocytes treated with methyl methanesulfonate. *Mutagenesis* 16, 121-125.
- Johnston, P.J., MacPhail, S.H., Stamato, T.D., Kirchgessner, C.U. e Olive, P.L., 1998. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. *Radiation Res.* 149, 455-462.
- Kada, T., Inoue, T. e Namiki, N., 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski, E.J. (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. Praeger, New York, pp. 137-151.
- Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T. e Nakamura, T., 1988. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry* 27, 2777-2779.
- Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Itoh, H., Hagiwara, T. e Nakamura, T., 1990. Formolysis of a Potent Antitumor (1-6)- $\beta$ -D-Glucan-Protein Complex from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies and Antitumor Activity of the Resulting Products. *Carbohydrate Polymers* 12, 393-403.
- Lewin, B., 2000. *Genes VII*. Oxford University Inc., New York.
- Littlefield, L.G., 1982. Effects of DNA-damaging agents on SCE. In: Sandberg, A.A. (Ed.), *Sister Chromatid Exchange*. Alan R. Liss Inc., New York, pp. 355-384.
- Menoli, R.C.N., Mantovani, M.S. Ribeiro, L.R., Gunter, S. e Jordão, B.Q., 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Res.* 496, 5-13.
- Mizushina, Y., Hanashima, L., Yamaguchi, T., Takemura, M., Sugawara, F., Saneyoshi, M., Matsukage, A., Yoshida, S. e Sakaguchi, K., 1998. A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochemical and Biophysical Res. Commun.* 249, 17-22.

- Mizushina, Y., Takahashi, N., Hanashima, L., Koshino, H., Esumi, Y., Uzawa, J., Sugawara, F. e Sakaguchi, K., 1999. Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7, 2047-2052.
- Mizushina, Y., Sagisaka, M., Sakai, H., Abe, M. e Sakaguchi, K., 2000. Mode analysis of binding of fatty acids to mammalian DNA polymerases. *Biochimica et biophysica Acta – Molecular and cell biology of lipids* 1486, 211-218.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Batipps, D.M. e Hungerford, D.A., 1960. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20, 613.
- Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Motoi, M e Yadomae, T., 2001. Antitumor beta-glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24, 820-828.
- Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J. e Miyazaki, T., 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*. *Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 114, 342-350.
- Perry, P. e Wolf, S., 1974. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 261, 156-158.
- Sasaki, Y.F., Sakaguchi, M., Yamagishi, T., Yamada, H. e Shihasu, Y. 1994. Bio-antitumor effects of unsaturated fatty acids included in fish oil – docosaheptaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 320, 9-22.
- Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A. e Yamazaki, S., 2001a. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. *Cell Structure and Function* 26, 103-108.
- Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K. e Niwa, A., 2001b. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells *in vitro*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65, 1645-1647.
- Swierenga, S.H.H., Heddle, J.A., Sigal, E.A., Gilman, J.P.W., Brillinger, R.L., Douglas, G.R. e Nestmann, E.R., 1991. Recommended protocols bases on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 246, 301-322.
- Stopper, H., Full, M., Helbig, R. e Speit, G., 1997. Micronucleus induction by neocarzinostatin and methylmethanesulfonate in ionizing radiation-sensitive Chinese hamster V79 cell mutants. *Mutation Res.* 383, 107-112.
- Takaku, T., Kimura, Y. e Okuda, H., 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition* 131, 1409-1413.

- Takusaburo, E. e Yoshiaki, F. 1998. Antitumor effect of peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy Dor.* 11, 249-265.
- Togashi, H., Mizushina, Y., Takemura, M., Sugawara, F., Koshino, H., Esumi, Y., Uzawa, J., Kumagai, H., Matsukage, A., Yoshida, S. e Sakaguchi, K., 1998. 4-Hydroxy-17-methylincisterol, an inhibitor of DNA polymerase-alpha activity and the growth of human cancer cells in vitro. *Biochemical Pharmacology* 56, 583-590.
- Waters, M.D., Brady, A.L., Stack, H.F. e Brockman, H.E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Res.* 238, 57-85.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, I., OLIVEIRA, N.G., LAIRES, A., RODRIGUES, A.S. e RUEFF, J. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. **Mutagenesis**, v. 15 n. 3, p. 229-234, 2000.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, n. 221 p. 1256-1264, 1983.
- AMES, B. N. Carcinogens and anticarcinogens, in: D.M. Shankel et al. (eds.) **Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms**. New York, Plenum, pp. 7-35, 1986.
- ANDERSON, D. e PLEWA, M. J. The International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 67-73, 1998.
- ANDERSON, D., YU, T. -W. e MC-GREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, n. 6, p. 539-555, 1998.
- ANDRIVON W., CALLAIS, F., NAFZIGER, J., MONNERET, C. e GUILLOSSON, J. J. A new anthracycline with potent antileukemic activity exhibits reduces mutagenicity. **Mutation Res.**, n. 344, p. 135-140, 1995.
- BIANCHI, L., MELLI, R., PIZZALA, R., STIVALA, L. A., REHAK, L., QUARTA, S. e VANNINI, V. Effects of  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -tocopherol on photogenotoxicity induced by 8-methoxypsoralen: The role of oxygen. **Mutation Res.**, n. 369, p. 183-194, 1996.
- BOEI, J. J. W. A., VERMEULEN, S. e NATARAJAN, A. T. Detection of chromosomal aberrations by fluorescence *in situ* hybridization in the first three post irradiation division of human lymphocytes. **Mutation Res.**, n. 349, p. 127-135, 1996.
- BRUSICK, D.J. **Principles of genetic toxicology**. 2ed. New York: Plenum Press, 1987.
- CARBONELL, E., VALBUENA, A., XAMENA, N., CREUS, A. e MARCOS, R. Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. **Mutation Res.**, n. 344, p. 127-134, 1995.
- CHANG, H. L., CHAO, G. R., CHEN, C. C. e MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 203-207, 2001.
- CHANG, R. Functional Properties of Edible Mushrooms. **Nutrition Reviews**, v.54, n. 11, p. S91-S93, 1996.

- CHERNG, S.-H, LIN, S. T., e LEE, H. Modulatory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of 1-nitropyrene: a structure-activity relationship study. **Mutation Res.**, n. 367, p. 177-185, 1996.
- CORTÉS, F., DAZA, P., PIÑERO, J. e ESCALZA, P. Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. **Mutation Res.**, n. 24, p. 203-207, 1994.
- CUI, X.-S., BERGMAN, J. e MÖLLER, L. Preneoplastic lesions, DNA adduct formation and mutagenicity of 5-, 7- and 9-hydroxy-2-nitrofluorene, metabolites of the air pollutant 2-nitrofluorene. **Mutation Res.**, n. 369, p. 147-155, 1996.
- DARROUDI, F. **Cytogenetic short term assays for genotoxicity post-graduate practical course 7-18 may**. Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Sylvius Laboratory, State University of Leiden, 1990.
- DARROUDI, F. e NATARAJAN, A. T. Cytogenetical characterization of repair-deficient CHO cell line 43-3B. I. Induction of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by UV and its modulation with 3-aminobenzamide. **Mutation Res.**, n. 149, p. 239-247, 1985.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, n. 402, p. 151-158, 1998.
- DELMANTO, R. D., DE LIMA, P. L. A., SUGUIA, M. M., SALVADORI, D. M. F., DA EIRA, A. F., SPEIT, G. e RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Res.**, n. 20, p.15-21, 2001.
- DOMÍNGUEZ, I., PASTOR, N., MATEOS, S. e CORTÉS, F. Testing the SCE mechanism with non-poisoning topoisomerase II inhibitors. **Mutation Res.**, n. 497, p. 71-79, 2001.
- DONGHUI, L., WANG, M., LIEHR, J. G. e RANDEARTH, K. DNA adducts induced by lipids and lipid peroxidation products: possible relationships to I-compounds. **Mutation Res.**, n. 344, p. 117-126, 1995.
- EKMEKCI, A., SAYLI, A., DÖNMEZ, H. e BAL, F. In vitro effects of prostaglandin E1 and indomethacin on mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in mitogen-stimulated human lymphocytes. **Mutation Res.**, n. 328, p. 49-53, 1995.
- FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P.L., e O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, n. 339, p. 37-59, 1995.
- FENECH, M. e MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Res.**, n. 147, p. 29-36, 1985.
- FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Res.**, n. 307, p. 395-410, 1994.

- FRIEAUFF, W., HARTMANN, A. e SUTER, W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.
- FRIEDBERG, E. **DNA Repair**. New York, W. H. Freeman and Company, v.1 e 2., 1984.
- GALLOWAY, S. M. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression and intriguing questions. **Mutation Res.** suppl. v. 23, n. 4, p. 44-53, 1994.
- GALLOWAY, S. M., MILLER, J. E., ARMSTRONG, M. J., BEAN, C. L., SKOPEK, T. R. e NICHOLS, W. W. DNA synthesis inhibition as a indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of reactive and non-DNA-reactive clastogens. **Mutation Res.**, n. 400, p. 169-186, 1998.
- GARCIA, C. L., CARLONI, M., DE LA PEÑA, N. P., FONTI, E. e PALITTI, F. Detection of DNA primary damage by premature chromosome condensation in human peripheral blood lymphocytes treated with methyl methanesulfonate. **Mutagenesis**, v. 16, n. 12, p. 121-125, 2001.
- GEBHART, E. Antimutagens: Data and Problems. *Humangenetik*, n. 24, p. 1-32, 1974.
- GOMES, E. M., SOUTOT, P. R. F. e FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. **Mutation Res.**, n. 367, p. 203-208, 1996.
- GRÜTER, A., FRIEDERICH, U. e WÜRGLER, F. E. Antimutagenic effects of mushrooms. **Mutation Res.**, n. 231, p. 243-249, 1990.
- GRÜTER, A., FRIEDERICH, U. e WÜRGLER, F. E. The mutagenicity of edible mushrooms in histidine-independent bacterial test system. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 29, n. 3, p. 159-165, 1991.
- HANNA, M.A., AL-DAKAN, A. A., ABOUL-ENEIN, H. Y. e OTHAIMEEN, A. A. Mutagenic and antimutagenic factor(s) extracted from a desert mushroom using different solvents. **Mutagenesis**, v. 4, n. 2, p. 111-114, 1989.
- HARRIS, J. B. ed. **Natural Toxins – Animal, plant and microbial**. Great Britain: Clarendon Press - Oxford, 1986.
- HARTMAN, P. E. e SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Envir. and Molec. Mutagenesis**, n. 15, p. 145-182, 1990.
- HAYATSU, H., ARIMOTO, S. e NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, n. 202, p. 429-446, 1988.

- HEDDLE, J. A., KNIZE, M. G., DAWOD, D. e ZHANG, X. –B. A test of the mutagenicity of cooked meats in vivo. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 103-107, 2001.
- JOHNSTON, P. J., MACPHAIL, S. H., STAMATO, T. D., KIRCHGESSNER, C. U. e OLIVE, P. L. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. **Radiation Res.**, v. 149, n. 5, p. 455-462, 1998.
- JOHNSTON, P. J., STOPPARD, E. e BRYANT, P. E. Induction and distribution of damage in CHO-K1 and the X-ray-sensitive hamster cell line xrs5, measured by the cytochalasin-B-cytokinesis block micronucleus assay. **Mutation Res./DNA Repair** v. 1, n. 385, p. 1-12. 1997.
- KADA, T. e SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens – Their Modes of action. **Bio Essays**, v. 7, n. 3, p. 113-115, 1987.
- KADA, T., KANEKO, K., MATSUZAKI, S., MATSUZAKI, T. e HARA, Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. **Mutation Res.**, n. 150, p. 127-132, 1985.
- KAWAGISHI, H., KATSUMI, R., SAZAWA, T., MIZUNO, T., HAGIWARA, T. e NAKAMURA, T. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2777-2779, 1988.
- KIRSCH-VOLDERS, M. e FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokineses block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 51-58, 2001.
- KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J. e AHNSTRÖM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Res.**, n. 363, p. 89-96, 1996.
- KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M. e SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 3, n.2, p. 103-115, 1995.
- KONG, M. S. e MA, T. H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Res.**, n. 426, p. 221-228, 1999.
- KURODA, Y. e HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Res.**, n. 436, p. 69-97, 1999.
- KURODA, Y. SHIMA, N., YAZAWA, K. e KAJI, K. Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. **Mutation Res.**, n. 497, p. 123-130, 2001.
- LEWIN, B. ed. **Genes VII**. USA: Oxford University Press, 2000.

- LIEBER, C. S. Herman Award Lecture, 1993: A personal perspective on alcohol, nutrition and the liver. **Amer. Journal of Clin. Nutr.**, n. 58, p. 430-442, 1993.
- LITTLEFIELD, L. G. Effects of DNA-damaging agents on SCE. In: SANDBERG, A. A. ed. **Sister Chromatid Exchange**. New York: Alan R. Liss Inc., pp. 355-384, 1982.
- LOHMAN, P. H. M., GENTILEB, J. M., GENTILEB, G. e FERGUSON, L. R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis: screening, methods and biomarkers. **Mutation Res.**, n. 496, p. 1-4, 2001.
- MALUF, S. W. e ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes os pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Res.**, n. 471, p. 21-27, 2000.
- MANOHARAN, K. e BANERJEE, M.R.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Bio. Intern. Reports*, v. 9, n. 9, p. 783-789, 1985.
- MATSUOKA, A., OZAKI, M., TAKESHITA, K., SAKAMOTO, H., GLATT, H. R., HAYASHI, M. e SOFUNI, T. Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12- dimethylbenz[a]anthracene in Chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. **Mutagenesis**, n. 12, p. 365-372, 1997.
- MATSUOKA, A., FURUTA, A., OZAKI, M., FUKUHARA, K. e MIYATA, N. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. **Mutation Res.**, n. 494, p. 107-113, 2001.
- MCKELVEY-MARTIN, V. M., HO, E. T. S., MCKEOWN, S. R., JOHNSTON, S. R., MCCARTHY, P. J., RAJAB, N. F. e DOWNES, C. S. Emerging applications of the single gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. **Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 1998.
- MENOLI, R. C. N., MANTOVANI, M. S. RIBEIRO, L. R., GUNTER, S. e JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Res.**, n. 496, p. 5-13, 2001.
- MERSCH, J., BEAUVAIS, M. e NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cell of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Res.**, n. 371, p. 47-55, 1996.
- MILLER, B., ALBERTI, S., LOCHER, F., THYBAUD, V. e LORGE, E. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Res.**, n. 192, p. 45-59, 1997.

- MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms – food, function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Rev. Int.**, v. 11, n. 1, p. 7-21, 1995.
- MIZUSHINA, Y., HANASHIMA, L., YAMAGUCHI, T., TAKEMURA, M., SUGAWARA, F., SANEYOSHI, M., MATSUKAGE, A., YOSHIDA, S. e SAKAGUCHI, K. A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 249, p. 17-22. 1998.
- MIZUSHINA, Y., SAGISAKA, M., SAKAI, H., ABE, M. e SAKAGUCHI, K. Mode analysis of binding of fatty acids to mammalian DNA polymerases. **Biochimica et biophysica Acta – Molecular and cell biology of lipids**, n. 1486, p. 211-218, 2000.
- MOON, T. E. e MICOZZI, M. S. **Nutrition and cancer prevention II: Investigating the role of macronutrients**. New York: Marcel Dekker, 1992.
- MORALES, P., BERMÚDEZ, E., SANZ, B. e HERNÁNDEZ, P. E. A study of the mutagenicity of some commercially canned spanish mushrooms. *Fd. Chem. Toxic.*, v. 28, n. 9, 607-611, 1990.
- MORRIS, S. M., DOMON, O. E., MCGARRITY, L. J., KODELL, R. L. e CASCIANO, D. A. Flow cytometric evaluation of cell-cycle progression in ethyl methanesulfonate e methyl methanesulfonate – exposed P3 cells: Relationship to the induction of sister-chromatid exchanges and cellular toxicity. **Mutation Res.**, n. 18, 139-149, 1991.
- MOTOI, I. A proposed battery of testes for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. **Mutation Res.**, n. 205, p. 397-407, 1988.
- ODIN, A. P. 1997. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Res.* 386, 39-67.
- OHNO, N., FURUKAWA, M., MIURA, N. N., ADACHI, Y., MOTOI, M. e YADOMAE, T. Antitumor beta-glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.
- OLIVE, P. L., WLODEK, D., DURAND, R. E. e BANÁTH, P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Exper. Cell Res.**, n. 198, p. 259-267, 1992.
- OSAKI, Y., KATO, T., YAMAMOTO, K., OKUBO, J. e MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus-blazei*. *Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 114, n. 5, p. 342-350, 1994.
- PALITTI, F. Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. **Mutation Res.**, n. 404, p. 133-137, 1998.

- PRESTON, R. J., SAN SEBASTIAN, J. R. e MCFEE, A. F. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Res.**, n. 189, p. 175-183, 1987.
- RABELLO-GAY M.N., RODRIGUES, M. A. L. R., MONTELEONE-NETO, R. eds. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação**. Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética, 1991.
- REHANA, Z., MALIK, A., e AHMAD, M. Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.), India. **Mutation Res.**, n. 367, p. 187-193, 1996.
- REIFFERSCHIED, G. e HEIL, J. Validation of SOS/*umu* test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Res.**, n. 369, p. 129-145, 1996.
- RIBAS, G., FRENZILLI, G., BARALE, R. e MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes avaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Res.**, n. 344, p. 41-54, 1995.
- RODRIGUES, M. A. La R. Teste CHO/HGPRT. In: RABELLO-GAY M.N., RODRIGUES, M.A. LA R. e MONTELEONE-NETO, R. eds. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação**, Soc. Brás. de Gen./ Rev. Bras. de Gen., pp. 67, 1991.
- ROSS, G. M., MCMILLAN, T. J., WILCOS, P. e COLLINS, A. R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications – Report on the 5<sup>th</sup> LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. **Mutation Res.**, n. 337, p. 57-60. 1995.
- ROSSER, P. F., RAMACHANDRAN, P., SANGAIAH, R., AUSTIN, R. N., GOLD, A. e BALL, L. M. Role of O-acetyltransferase in activation of oxidised metabolites of the genotoxic environmental pollutant 1-nitropyrene. **Mutation Res.**, n. 369, p. 209-220, 1996.
- SAKAMOTO-HOJO, E. T. e TAKAHASHI, C. S. Clastogenic action of ellipticine over the cell cycle of human lymphocytes and influence of post-treatments with caffeine and ara-C at G2. **Mutation Res.**, n. 248, p. 195-202, 1991.
- SASAKI, Y. F., SAKAGUCHI, M., YAMAGISHI, T., YAMADA, H. e SHIRASU, Y. Bio-antclastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil – docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Res.**, n. 320, p. 9-22, 1994.
- SCHWARTZ, N. B. Perspective: Reproductive endocrinology and human health in the 20th century - A personal retrospective. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2163-2166, 2001.

- SHEPHARD, S. E., GUNZ, D. e SCHLATTER, C. Genotoxicity of Agaritine in the *lacI*, transgenic mouse mutation assay: evaluation of the health risk of mushroom consumption. **Food Chem. Toxic.**, n. 13, p. 257-264, 1995.
- SIMIČ, D., VUKOVIČ-GAČIČ, B., e KNEČEVIČ-VUKČEVIČ, J. Detection of natural bio-antimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. **Mutation Res.**, n. 402, p. 51-57, 1998.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. e SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Research**, n. 175, 184-191, 1988.
- SMITH, J. E. e MOSS, M. O. eds. **Mycotoxins - Formation, Analysis and Significance**. Great Britain: John Wilwy & Sons Ltd., 1985.
- SORIMACHI, K., AKIMOTO, K., IKEHARA, Y., INAFUKU, K., OKUBO, A. e YAMAZAKI, S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 2, p. 103-108, 2001a.
- SORIMACHI, K., IKEHARA, Y., MAEZATO, G., OKUBO, A., YAMAZAKI, S., AKIMOTO, K. e NIWA, A. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells *in vitro*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 7, p. 1645-1647, 2001b.
- SPEIT, G. e HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D. S. ed. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, pp. 203-211, 1999.
- SPEIT, G., HANELT, S., HELBIG, R., SEIDEL, A. e HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, n. 88, p. 91-98, 1996.
- STERNER, O., BERGMAN, R. KESLER, E. MAGNUSSON, G. NILSSON, L. WICKBERG, B. ZIMERSON E. e ZETTERBERG, G. Mutagens in larger fungi - I. Forty-eight species screened for mutagenic activity in the Salmonella/Microsome assay. **Mutation Res.**, n. 101, p. 269-281, 1982.
- STOPPER, H., FULL, M., HELBIG, R. e SPEIT, G. Micronucleus induction by neocarzinostatin and methylmethanesulfonate in ionizing radiation-sensitive Chinese hamster V79 cell mutants. **Mutation Res.**, n. 383, p. 107-112, 1997.
- SURH, Y. -J, SHLYANKEVICH, M., LEE, J. W. e YOO, J. -K. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo[a]pyrene by isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. **Mutation Res.**, n. 367, p. 219-224, 1996.

- SURRALLÉS, J., XAMENA, N., CREUS, A., CATALÁN, J., NORPPA, H. e MARCOS, R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. **Mutation Res.**, n. 341, p. 169-184, 1995.
- SWIERENGA, S. H. H., HEDDLE, J. A., SIGAL, E. A., GILMAN, J. P. W., BRILIINGER, R. L., DOUGLAS, G. R. e NESTMANN, E. R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Res.**, n. 246, p. 301-322, 1991.
- TAIOLI, E., NICOLOSI, A. e WYNDER, E.L. Dietary habits and breast cancer: A comparative study of the United States and Italian data. **Nutr. Cancer**, n. 16, p. 259-265, 1991.
- TAKAKU, T., KIMURA, Y. e OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1409-1413, 2001.
- TAKEDA, Y., TOGASHI, H., SHINZAWA, H., MIYANO, S., ISHII, R., KARASAWA, T., TAKEDA, Y., SAITO, T., SAITO, K., HAGA, H., MATSUO, T., AOKI, M., MITSUHASHI, H., WATANABE, H. e TAKAHASHI, T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 9, p. 1079-1086, 2000.
- TARDIFF, R. G., LOHMAN, P. H. M. e WOGAN, G. N. **Methods to assess DNA damage and repair: Interspecies comparisons**. Grã-bretanha: John Wiley & Sons, (SCOPE; 52) (IPCS; 19) (SGOMSEC; 8), 1994.
- TICE, R. R. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips, D.H. e Venitt, S. eds. **Environmental Mutagenesis**, Oxford: Bios Scientific Publishers, pp. 315-339, 1995.
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J. -C. e SASAKI, Y. F. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. **Mutation Res.**, n. 35, p. 206-221, 2000.
- TOGASHI, H., MIZUSHINA, Y., TAKEMURA, M., SUGAWARA, F., KOSHINO, H., ESUMI, Y., UZAWA, J., KUMAGAI, H., MATSUKAGE, A., YOSHIDA, S. e SAKAGUCHI, K. 4-Hydroxy-17-methylincisterol, an inhibitor of DNA polymerase-alpha activity and the growth of human cancer cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 583-590. 1998.
- TOTH, B. e ERICKSON, J. Cancer Induction in Mice by Feeding of the Uncooked Cultivated Mushroom of Commerce *Agaricus bisporus*. **Cancer Res.**, n. 46, p. 4007-4011, 1986.

- TRICHOPOULOU, A., KATSOUYANNI, K., STUVER, S., TZALA, L., GNARDELLIS, C., RIMM, E. e TRICHOPHOULOS, D. Consumption of olive oil and especific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. **J. Natl. Cancer Inst.**, n. 87, p. 110-116, 1995.
- TROSKO, J.E. Challenge to the simple paradigm that “carcinogens” are “mutagens” and to the *in vitro* and *in vivo* assays used to test the paradigm. **Mutation Res.**, n. 373, p. 245-249, 1997.
- TUCKER, J. e PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Res.*, n. 365, p. 147-159, 1996.
- VANHAUWAERT, A., VANPARYS, P. e KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vivo* micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. *Mutagenesis*, v. 16, n. 1, p. 39-50, 2001.
- VARELLA-GARCIA, M. Teste de Trocas entre cromátides irmãs (TCI). In: RABELLO-GAY M.N., RODRIGUES, M.A. LA R. e MONTELEONE-NETO, R. eds. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação**. Soc. Brás. de Gen./ Rev. Bras. de Gen. pp. 123-140, 1991.
- VZRÖC, M E PETRAS, M. L. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood assays in detecting DNA damage cause by direct and indirect acting mutagens. **Mutation Res.**, n. 381, p. 31-40, 1997.
- WATERS, M. D., BRADY, A. L., STACK, H. F. e BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Res.*, n. 238, p. 57-85, 1990.
- WYNDER, E. L. e HOFFMANN, D. Smoking and lung cancer: Scientific challenges and opportunities. **Cancer Res.**, n. 54, p. 5284-5295, 1994.
- WYNDER, E. L., FUJITA, Y., HARRIS, R. E., HIRAYAMA, T. e HIYAMA, T. Comparative epidemiology of cancer between the United States and Japan: a second look. **Cancer**, n. 67, p. 746-763, 1991.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1: OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE AGARICUS BLAZEI MURILL**

### **Extratos aquosos do *Agaricus blazei* Murill**

Os extratos aquosos foram obtidos, utilizado-se o pó do basidiocarpo em duas fases de desenvolvimento, esporulado e jovem, da linhagem AB97/11 do *Agaricus blazei* Murill, fornecidos pelo Prof. Dr. Augusto Eira da Faculdade de Agronomia de Botucatu, UNESP, São Paulo.

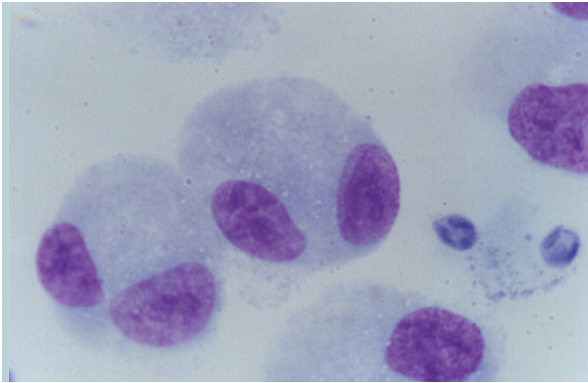
Os chás foram preparados através da dissolução de 5g de pó de basidiocarpo em 200ml de água deionizada. A solução foi levada para agitação por 10 minutos, com o béquer protegido com papel alumínio. A partir da agitação a suspensão era encaminhada para uma das três temperaturas de extração: (a) gelado, mantido durante 1 hora na geladeira 4°C, agitado manualmente de vez em quando; (b) ambiente, mantido por 2 horas em temperatura ambiente 21°C, agitando de tempos em tempos; (c) aquecido, mantido à 60°C em banho-maria, por 5 minutos, e posteriormente deixado em repouso por 15 minutos para resfriamento. Com o término do tempo de extração a suspensão foi filtrada primeiramente com papel de filtro duplo e em seguida filtrada em sistema de filtração à vácuo com membrana millipore 0,22 µm, para esterilização. Os chás foram aliquotados em frascos de criocongelamento e descongelados conforme o uso.

### **Extratos orgânicos do *Agaricus blazei* Murill**

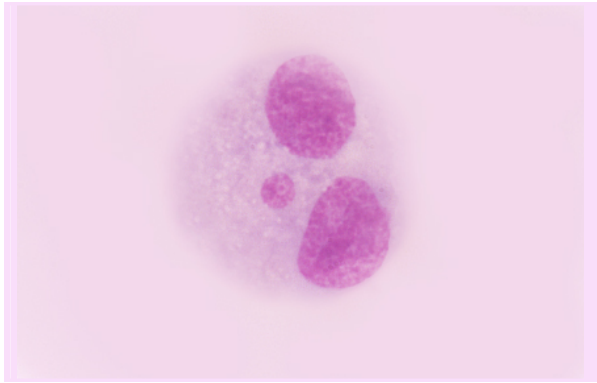
Os extratos orgânicos do cogumelo do sol foram preparados com o solvente etanol absoluto e clorofórmio/metanol (3:1). Os extratos foram obtidos, utilizado-se o pó do basidiocarpo da linhagem AB97/11 do *Agaricus blazei* Murill, também fornecido pelo Prof. Dr. Augusto Eira.

Os extratos foram preparados através da dissolução de 7,5g de pó de basidiocarpo em 150ml do solvente. A suspensão foi encaminhada para agitação por 5 horas. Terminado o primeiro ciclo de extração o conteúdo foi filtrado em papel de filtro duplo, reservando o solvente, e o pó foi novamente suspenso em 150ml de solvente novo e encaminhado para agitação de 5 horas. Terminado o segundo ciclo a suspensão foi filtrada e os 300ml de extrato foram encaminhado para evaporação. Os solventes foram totalmente evaporados utilizando-se um sistema à vácuo, com rotação e aquecimento leve 50°C. Posteriormente os resíduos foram suspensos em 5ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em 145ml de PBS. Os extratos foram aliqüotados em frascos de crio-congelamento e descongelados conforme o uso.

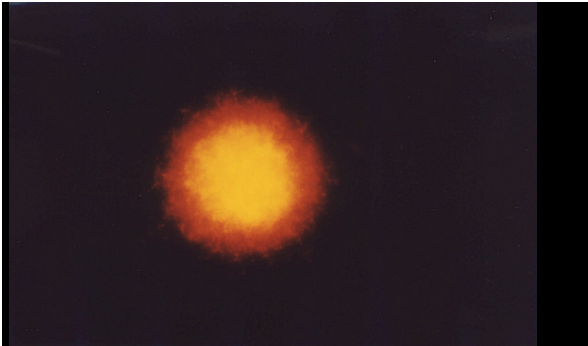
## ANEXO 2: FOTOS DE MICROSCOPIA



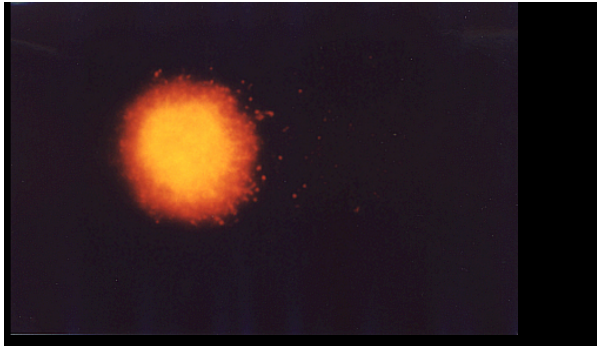
01



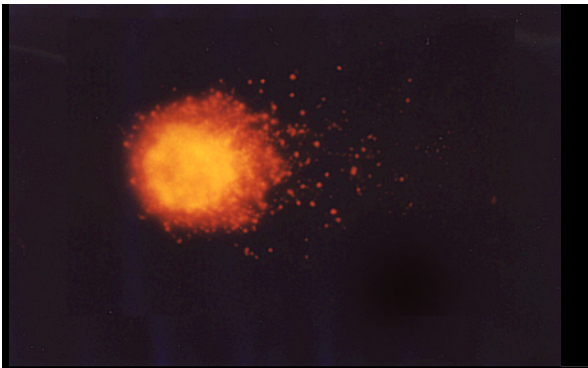
02



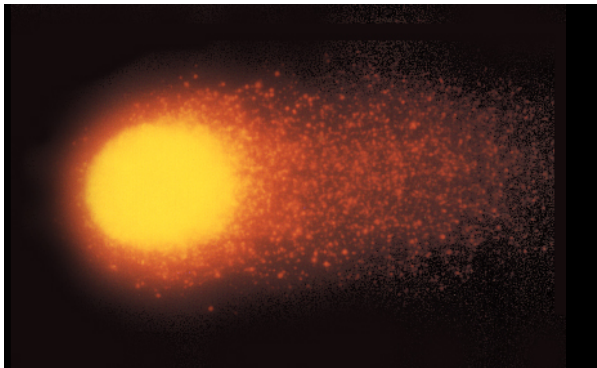
03



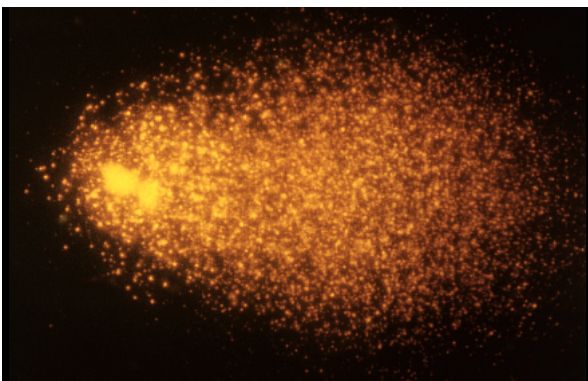
04



05



06



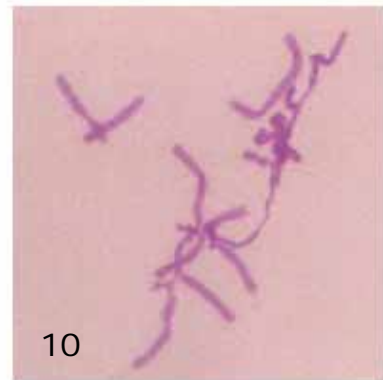
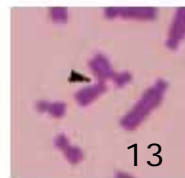
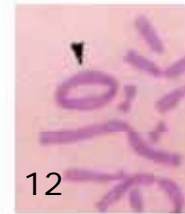
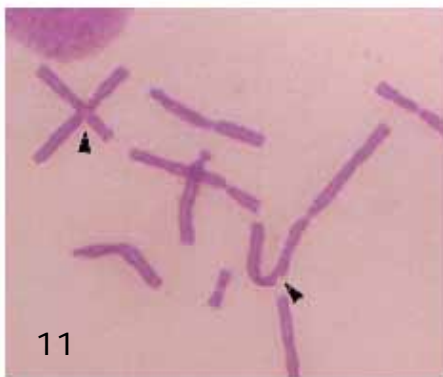
07

### Teste do Micronúcleo

- 01. Célula Binucleada Normal
- 02. Célula Binucleada com micronúcleo

### Teste do Cometa

- 03. Núcleo classe zero
- 04. Núcleo classe 1
- 05. Núcleo classe 2
- 06. Núcleo classe 3
- 07. Núcleo apoptótico



### Aberrações Cromossômicas

- 08. Metáfase Normal
- 09. Quebra isocromatídica
- 10. Rearranjo Complexo
- 11. Quebra cromatídica e rearranjo tetrarradial
- 12. Anel Cromossômico
- 13. Rearranjo Trirradial

### Troca entre Cromátides Irmãs

- 14. Coloração diferencial, Metáfase de segundo ciclo