



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRA ERNST KERCHE SILVA

**DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DE POSSÍVEIS EFEITOS
GENOTÓXICOS E PROTETORES DA β -GLUCANA
BOTRIOSFERANA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Londrina
2010

LEANDRA ERNST KERCHE SILVA

**DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DE POSSÍVEIS EFEITOS
GENOTÓXICOS E PROTETORES DA β -GLUCANA
BOTRIOSFERANA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Biotecnologia, como requisito parcial ao título
de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo
Barbosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos
Cólus

Londrina
2010

LEANDRA ERNST KERCHE SILVA

**DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DE POSSÍVEIS EFEITOS
GENOTÓXICOS E PROTETORES DA β -GLUCANA BOTRIOSFERANA
EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Biotecnologia, como requisito parcial ao título
de mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa
UFPR – Curitiba – PR

Profa. Dra. Marialba Avezum Alves de Castro Prado
UEM – Maringá – PR

Prof. Dr. Wagner José Martins Paiva
UEL – Londrina - PR

Londrina, 27 de abril de 2010.

**Dedico ao meu filho João Marcos e ao meu marido João Lucas,
razões da minha vida.**

*“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.
Amém.”*

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido João Lucas por todos os momentos ao meu lado, por toda a força dada, por todo o amor. Todo esse tempo junto me fez uma pessoa incrivelmente melhor e a minha vida em si, hoje, é muito mais porque você existe. Eu te amo de todo o meu coração.

Ao meu filho João Marcos, presente de Deus, gerado ao longo deste curso. A sua chegada tornou tudo mais lindo e muito mais fácil, por incrível que pareça, simplesmente porque tudo ganhou novo sentido. Agora, tudo é por você. Mamãe te ama mais do que tudo, filho.

Aos meus pais, Marcos e Sandra, por todo o investimento feito, por todo o carinho e amparo e, especialmente, por acreditarem em mim. Acreditar que um dia eu alcançaria muitas vitórias. E vocês sabem o quanto a conclusão deste mestrado é uma grande vitória para mim. Obrigada por sempre me ajudar em todas as adversidades. Seja com amor e conselhos, seja financeiramente. O amor por vocês será sempre infinito, mais do que um dia poderei calcular.

À minha irmã Renata por ser sempre tão generosa e mostrar que me ama das formas mais absurdas. Apesar das formas diferentes de pensar, não consigo imaginar minha vida um minuto sequer sem você. Amo-te.

Aos meus sogros, Sonia e João, e também aos meus cunhados, Bruno e André, por terem me abraçado como filha e irmã e me darem tanto suporte e carinho. Vocês são minha nova família. Eu adoro vocês.

À minha amiga Juliana Mara Serpeloni que mesmo longe consegue me transmitir amor e sabedoria. Eu te admiro sempre por ser uma das pessoas mais capazes e inteligentes que conheço. Obrigada por sua amizade. Como sempre te digo, jamais encontrarei alguém igual a você. Eu te aminho sempre.

Às minhas amigas Juliana Mazzuchelli e Juliana Bório Ferreira Garcia por

serem tão especiais e indispensáveis em minha vida. Obrigada pelo carinho sempre. Amo vocês.

Aos meus grandes amigos de infância (Joe, Bruno, Duda e Saita) por fazerem parte de todos os momentos de minha vida. Vocês fizeram o meu mundo muito melhor. Se hoje sou o que sou, vocês têm grande parcela nisso. Amo vocês.

Aos anjos do laboratório de Mutagênese e Oncogenética, especialmente a Maressa e a Mariana, que me fizeram acreditar mais ainda que Deus exista. Isto porque este trabalho não teria sido realizado se não fosse toda a ajuda e ensinamento de vocês. A minha gratidão eternamente.

Ao meu amigo Mateus por ter me dado tanta motivação e ter me feito apaixonar pelos testes de mutagênese. Jamais esquecerei.

À minha orientadora Aneli de Melo Barbosa por me fazer apaixonar pela botriosferana. Por me mostrar que somente com trabalho duro coisas boas são feitas. O seu profissionalismo me fez objetivar o sucesso. Obrigada.

À minha co-orientadora Ilce Mara de Syllos Cólus que também considero um anjo em minha vida. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório para que o meu trabalho pudesse ser feito. Obrigada por toda a confiança e carinho, e até mesmo pelas bronquinhas.

À Sara S. Bernardes e à Prof.^a Dr.^a Alessandra L. Cecchini do Laboratório de Patologia Experimental por terem me ajudado a concluir meu trabalho, emprestando seu tempo e equipamentos para que os teste fossem realizados. Muito obrigada.

À todos os funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, especialmente aos colegas de mestrado e ao técnico Nelson, por terem me ajudado com o companheirismo e com a motivação para não desistir nunca.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida durante o desenvolvimento deste projeto.

KERCHE-SILVA, Leandra Ernst. **Determinação *in vitro* de possíveis efeitos genotóxicos e protetores da β -glucana botriosferana em células de mamíferos.** 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros produzidos por microrganismos como bactérias e fungos e que possuem atividade como modificadores de resposta biológica. O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* produz uma β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana conhecida como botriosferana quando cultivado em diversas fontes de carbono. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos mutagênicos, genotóxicos e protetores da botriosferana. O fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi cultivado em meio líquido em sacarose comercial como única fonte de carbono, e o EPS produzido foi dialisado e liofilizado, e então redissolvido em salina isotônica e reservado para os ensaios biológicos. As atividades protetoras e genotóxicas da botriosferana foram testadas através do teste do micronúcleo, do ensaio do cometa e da avaliação do consumo de oxigênio usando células V79, HTC e eritrócitos humanos contra o quimoterápico doxorrubicina e os geradores de ROS peróxido de hidrogênio, benzo[a]pireno e *tert*-butil hidroperóxido. Três concentrações deste EPS foram usadas nos testes, 7,5, 30 e 100 μ g/mL. Os resultados mostraram que a botriosferana não apresentou atividade mutagênica em nenhum das três concentrações avaliadas e diminuiu os efeitos mutagênicos da doxorrubicina, do peróxido de hidrogênio e do benzo[a]pireno resultando em uma diminuição da frequência de micronúcleos de 90 a 95%. O ensaio do cometa mostrou uma atividade genotóxica de classe 1 para a botriosferana, o que não foi significativo já que o dano não foi permanente, comprovado pelo teste do micronúcleo. A botriosferana também foi capaz de proteger a membrana celular de eritrócitos humanos da lipoperoxidação provocada pelo *tert*-butil hidroperóxido. Vários mecanismos podem ser propostos para se explicar os efeitos protetores da botriosferana, entre eles a atividade antioxidante, a modulação de enzimas antioxidantes e os mecanismos de desmutagênese e bioantimutagênese. Conclui-se, então, que a botriosferana é um quimopreventivo e antioxidante interessante; mais estudos devem ser realizados para se aprovar a utilização da botriosferana para consumo humano.

Palavras-chave: Efeitos protetores. Bioantimutagênese. Exopolissacarídeos. Botriosferana.

KERCHE-SILVA, Leandra Ernst. *In vitro* determination of possible genotoxic and protective effects of the β -glucan botryosphaeran in mammalian cells. 2010. 99 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are biopolymers produced by microorganisms such as bacteria and fungi and possess biological modifying response activities. The ascomyceteous fungus *Botryosphaeria rhodina* produces a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan known as botryosphaeran when grown in several carbon sources. The objective of this study was to evaluate the mutagenic, genotoxic and protective effects of botryosphaeran. *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was grown in liquid medium on commercial sucrose as sole carbon source, and the EPS produced dialysed and lyophilized, and then re-dissolved in isotonic saline solution and stored for biological assays. The protective and genotoxic activities of botryosphaeran were tested by the micronucleus test, comet assay and oxygen uptake test using V79, HTC and erythrocyte cells, against the chemotherapeutic drug doxorubicin and the reactive oxygen species inducers H₂O₂, benzo[a]pyrene and *tert*-butyl hydroperoxide. Three concentrations of the EPS were used in the tests, 7.5, 30 and 100 μ g/ml. The results showed that botryosphaeran itself was devoid of mutagenic activity at the three concentrations evaluated and decreased the mutagenic effect of doxorubicin, hydrogen peroxide and benzo[a]pyrene-induced micronucleus formation resulting in a reduction of the frequency of micronucleus of 90-95%. The comet assay also showed a genotoxic activity of class 1 for the botryosphaeran, that was not significant, since the damage was not permanent, proved by micronucleus test. The botryosphaeran was also able to protect the cell membrane of human erythrocytes against lipoperoxidation of the *tert*-butyl hydroperoxide. Several mechanisms can be proposed to explain these protective effects of the botryosphaeran, including antioxidant activity, modulation of antioxidant enzymes expression and desmutagenic and bioantimutagenic mechanisms. Concluding, botryosphaeran is an interesting chemopreventive and oxidant protector compound; more studies should be accomplished in order to approve this glucan for human use.

Keywords: Protective effects. Bioantimutagenesis. Exopolysaccharides. Botryosphaeran.

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Tabela 1** – Frequency of micronucleated cells (MN cells) and nuclear division index (NDI) obtained in the determination of mutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective control in cultured V79 cells..... 56
- Tabela 2** – Frequency of micronucleated cells (MN cells) and nuclear division index (NDI) obtained in the determination of mutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective control in cultured HTC cells..... 57
- Tabela 3** – Number of cells observed in each comet class of a total of 300 cells analyzed per treatment and their respective mean scores when assessing the genotoxicity of three different concentrations of botryosphaeran in V79 cells *in vitro* 58
- Tabela 4** – Number of cells observed in each comet class of a total of 300 cells analyzed per treatment and their respective mean scores when assessing the genotoxicity of three different concentrations of botryosphaeran in HTC cells *in vitro* 59

Artigo B

- Tabela 1** – Frequency of micronucleated cells (MN cells), nuclear division index (NDI) and % reduction of damage obtained in the determination of antimutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective controls in cultured V79 cells 76
- Tabela 2** – Frequency of micronucleated cells (MN cells), nuclear division index (NDI) and % reduction of damage obtained in the determination of antimutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective controls in cultured HTC cells 77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de uma glucana produzida por fungo, apresentando ligações β -(1→3, 1→6).....	17
Figura 2 – Classes de danos no ensaio do cometa, sendo 0, 1, 2 e 3 as respectivas classes de danos.....	25
Figura 3 – Ataque eletrofilico do radical hidroxila ao grupo metil ligado ao carbono 5 da timina gerando um radical alil.....	28
Figura 4 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de H_2O . Várias ROS são formadas no processo	31
Figura 5 – Esquema representativo dos tratamentos realizados em placas de 96 poços para o teste MTT.....	39
 Artigo A	
Figura 1 – Cytotoxicity in V79 cells treated with botryosphaeran.....	55
Figure 2 – Cytotoxicity in HTC cells treated with botryosphaeran.....	55
 Artigo B	
Figura 1 – Qualitative Total Antioxidant Activity (TRAP) of botryosphaeran.....	78
Figura 2 – Action of botryosphaeran in membrane erythrocytes	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	GLUCANAS	13
1.2	BOTRIOSFERANA	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	A NUTRIÇÃO LIGADA À CARCINOGENESE	16
2.2	AS B-GLUCANAS E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	17
2.2.1	Glucanas e a Resposta Imune	19
2.2.2	Glucanas e a Ação Antitumoral	20
2.2.3	Exemplos de β -glucanas	21
2.3	ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE	23
2.3.1	Ensaio Cometa	24
2.3.2	Teste do Micronúcleo	26
2.4	ANTIMUTAGENICIDADE	27
2.5	DANOS OXIDATIVOS NO DNA	27
2.5.1	Doxorrubicina	29
2.5.2	Peróxido de Hidrogênio	30
2.5.3	Benzo[a]pireno	31
2.6	BOTRIOSFERANA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	AGENTES QUÍMICOS	36
4.1.1	Doxorrubicina (DXR)	36
4.1.2	Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	36
4.1.3	Benzo[a]pireno (B[a]P)	36
4.2	PROCEDIMENTOS	37
4.2.1	Micro-Organismo e Condições de Cultivo	37
4.2.2	Produção da β -glucana Botriosferana	37

4.2.3	Preparo das Soluções.....	38
4.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – TESTE DO MTT	38
4.4	LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	40
4.5	TESTE DO MICRONÚCLEO.....	40
4.5.1	Indução de Células Binucleadas.....	42
4.5.2	Colheita de Micronúcleos para Células.....	42
4.5.3	Preparo de Lâminas de Células V79 e HTC.....	42
4.5.4	Índice de Divisão Nuclear	43
4.5.5	Efeito Antimutagênico	43
4.6	ENSAIO DO COMETA	43
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
4.8	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	44
4.9	AValiação do Consumo de Oxigênio de Hemáceas	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ARTIGO A	47
5.2	ARTIGO B.....	67
	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos, também chamados glicanas, são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos dos mais abundantes e importantes da biosfera, como, por exemplo, celulose e amido nas plantas e glicogênio nos animais (GLAZER; NIKKAIDO, 1995; BARBOSA et al, 2004).

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície celular ou são excretados para o meio extracelular, na forma de limo (SUTHERLAND, 1998). Nos fungos, os EPS constituem uma percentagem da biomassa, participando com mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede das hifas (GUTIÉRREZ et al, 1996).

As propriedades físicas e fisiológicas dos polissacarídeos são determinadas pelas diferenças químicas tais como: tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação e composição monossacarídica (GUTIÉRREZ et al, 1996). Por exemplo, grandes variações no grau de ramificação desses polímeros podem afetar a sua solubilidade (SUTHERLAND, 1998).

Os microrganismos são adaptados ao meio ambiente natural onde vivem, pois nele existem fatores limitantes como fontes de carbono e nitrogênio, aeração, agitação, microelementos, entre outros, e isso confere a eles um estado de homeostase. Na produção de EPS por fungos, deve ser considerada a cepa fúngica escolhida como também o seu meio ambiente natural para adequar, em laboratório, o meio de cultivo em termos de características nutricionais (BARBOSA et al, 2004).

1.1 GLUCANAS

Glucanas são polímeros de glucose amplamente distribuídos na natureza e classificadas conforme o tipo de ligação glicosídica [α , β] da cadeia principal (CORRADI DA SILVA et al, 2006). As β -glucanas são a forma predominante encontrada em fungos (WILLIAMS, 1997).

A função específica da glucana na fisiologia do fungo não está completamente esclarecida; entretanto, considera-se que sua principal função estrutural seja auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular (SEVIOUR et al, 1992). Tem sido sugerido que as glucanas extracelulares dos fungos lignolíticos desempenham um importante papel na degradação da lignina, como fonte indireta de peróxido de hidrogênio (KRCMAR et al, 1999). Outra participação deste exopolissacarídeo no metabolismo do fungo, em particular daqueles que degradam madeira, seria a de atuar como um suporte para adsorção das enzimas excretadas e, finalmente, acredita-se que o exopolissacarídeo protegeria a hifa da desidratação, bem como regularia a concentração da glucose extracelular (BUCHALA et al, 1987).

Os EPS microbianos são mais conhecidos por suas propriedades espessantes, gelificantes e emulsificantes; porém outra possibilidade de aplicação desses biopolímeros é na saúde humana (CORRADI DA SILVA et al, 2006). Várias pesquisas sobre polissacarídeos fúngicos têm se concentrado em aplicá-los como agentes antitumorais (MAZIERO et al, 1999). Podem ainda ser utilizados no controle da formação de leucócitos (efeito antiinflamatório), no tratamento da artrite reumatóide, na síntese de antígenos para a produção de anticorpos (imunização), no efeito protetor contra danos oxidativos no DNA (SLAMENOVÁ et al, 2003), na interação com lipoproteínas de baixa densidade por meio de forças de Van der Waals, que resulta na eliminação da fração lipídica do compartimento sangüíneo (SHINGEL, 2004), e em cosméticos como agentes de hidratação da pele (VANHOOREN et al, 1999).

Entre os polissacarídeos biologicamente ativos, as D-glucanas tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) revelaram-se compostos potentes, sendo efetivos contra tumores. Lentinana e esquizofilana, duas glucanas fúngicas β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), tornaram-se clinicamente relevantes como imunoadjuvantes na terapia contra o câncer, no Japão. Estas glucanas, não citotóxicas, supostamente expressam seu efeito antitumor por estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (CORRADI DA SILVA et al, 2006). Acredita-se que a ação aconteça, principalmente, pela ativação das células T “helper”, células “natural killer” e macrófagos citotóxicos e células T citotóxicas (GOMAA et al, 1992). Estudos recentes mostram que as glucanas β -(1 \rightarrow 3) modulam o sistema imunológico pela ativação dos macrófagos, através da ligação do polímero a receptores específicos destas células (WILLIAMS, 1997). Esta atividade antitumor parece estar relacionada à estrutura química da cadeia principal da

glucana na forma de tripla hélice, à frequência e complexidade das cadeias laterais e à sua massa molecular (SCHMID et al, 2001).

1.2 BOTRIOSFERANA

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 produz uma família de (1→3; 1→6)-β-D-glucanas denominadas botriosferanas quando cultivado em diferentes fontes de carbono (VASCONCELOS et al, 2008). A botriosferana é uma glucana solúvel em água constituída por uma cadeia principal formada por unidades de (1→3)-β-D-glucopiranosil e às quais estão ligados resíduos de (1→6)-β-D-glucosil e diglucosil (BARBOSA et al, 2003). A botriosferana pode apresentar mais ou menos pontos de ramificação ao longo da cadeia principal de acordo com os substratos utilizados durante a fermentação (CORRADI DA SILVA et al, 2005).

Nos primeiros estudos biológicos com esta biomacromolécula, ela se apresentou, em ensaios *in vivo*, não-mutagênica e fortemente antimutagênica, com até 82% de redução de micronúcleos em sangue periférico de camundongos (*Mus musculus*) (MIRANDA et al, 2008), e também mostrou grande diminuição (48%) na taxa de açúcar sangüíneo de ratos Swiss albinos diabéticos (u.d.).

Tanto as propriedades não mutagênicas, antimutagênicas e hipoglicemiante desta glucana, quanto a sua forma de produção estão em patentes nacionais (PCT/BR2007/000334) e internacionais (u.d.).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A NUTRIÇÃO LIGADA À CARCINOGENESE

Devido ao avanço da medicina em todas as suas áreas nos últimos 100 anos, ocorreu um aumento na expectativa de vida da população global, o que proporcionou um maior número de mortes por doenças degenerativas como o câncer, as doenças cardiovasculares e as doenças neurodegenerativas. Realizar um controle dessas doenças torna-se complicado por apresentarem naturezas multifatoriais; porém, no caso do câncer, a expectativa de sobrevivência, hoje, pode chegar a 20 anos devido a vários estudos relacionados às doenças neoplásicas (CIMONS et al, 1998; LEVI et al, 2002; DE FLORA et al, 2005).

Aos compostos químicos ou processos celulares que alteram a estrutura do DNA tem sido atribuído o principal fator do surgimento do processo de carcinogênese, resultado de uma mutação que possibilita a ativação de oncogenes ou a supressão de heterozigosidade de genes que realizam supressão tumoral (FERGUSON et al, 2004). O surgimento de neoplasias em diversos órgãos tem sido conectado diretamente a uma dieta inapropriada, especialmente para os cânceres de estômago, cólon, próstata e mama (WCRF/AICR, 1997).

Os mutágenos mais comuns presentes nos alimentos são compostos N-nitrosos (alimentos embutidos e cervejas); toxinas fúngicas (aflatoxinas e fumonisinas); aminas aromáticas heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (compostos formados no preparo de carnes); e componentes de alimentos ricos em carboidratos (acrilamida) (LAYTON et al, 1995; GELDERBLUM et al, 2001; JAGERSTAD e SKOG, 2005).

No entanto, diversos compostos obtidos na dieta conseguem, comprovadamente, diminuir os danos no DNA e, conseqüentemente, a freqüência de cânceres, sendo denominados antimutagênicos (LOEB et al, 2003). Muitas substâncias obtidas a partir de fontes naturais têm sido isoladas, identificadas e seus mecanismos biológicos esclarecidos. As β -glucanas entram no grupo dessas substâncias e já têm sido

extensivamente usadas na China e no Japão para a prevenção e tratamento do câncer (CHEN e SEVIOUR, 2007).

2.2 AS B-GLUCANAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Nas paredes celulares de diversos organismos vivos – como cereais, plantas, algas, bactérias, fungos e leveduras – podem ser encontrados polissacarídeos constituídos de unidades D-glucopiranosil denominadas glucanas. A estrutura molecular das glucanas depende tanto da fonte como do método de isolamento. No esqueleto linear central desses polissacarídeos encontram-se as unidades D-glucopiranosil unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3); algumas glucanas podem apresentar ramificações que podem ser do tipo β -(1 \rightarrow 4) ou β -(1 \rightarrow 6) e essas ramificações vão determinar a estrutura terciária da glucana que é estabilizada por pontes de hidrogênio intracadeia (ZEKOVIC et al, 2005).

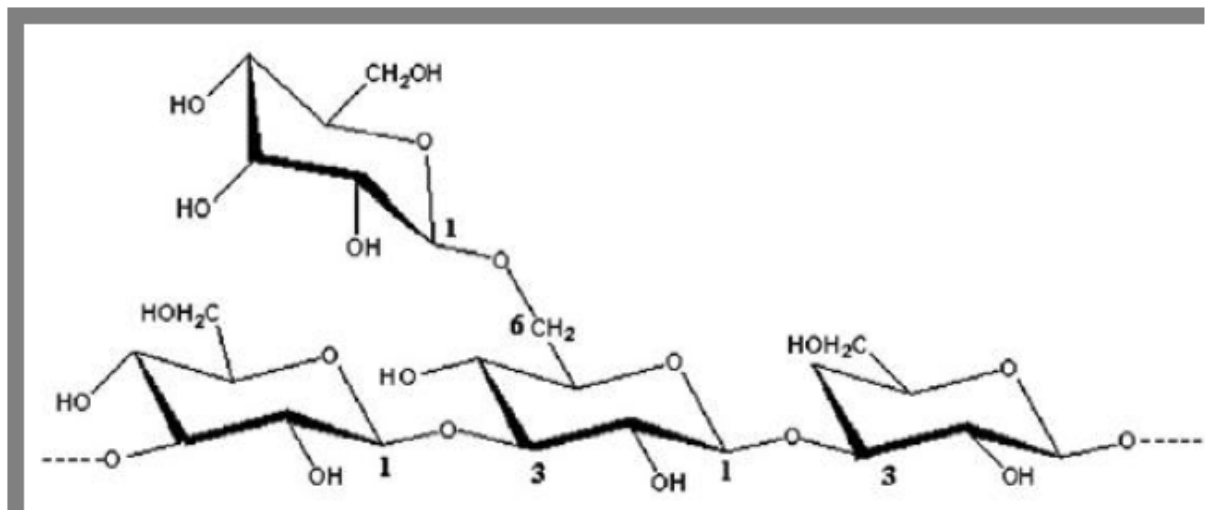


Figura 1 – Estrutura de uma glucana produzida por fungo, apresentando ligações β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)
 Fonte: Chen e Seviour (2007).

Nos fungos, as (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucanas são importantes componentes da superfície celular, devido ao seu envolvimento nas mudanças morfológicas, assim como na estabilização de associações patogênicas e simbióticas com animais e plantas superiores

(ASADA et al, 1982). Esses polissacarídeos fazem o papel de moldura estrutural na célula fúngica definindo sua forma e rigidez e acabam servindo também como reserva de carboidrato para os fungos. Como componentes mais abundantes da célula fúngica, essas glucanas e as enzimas (1→3)-β-hidrolases e sintetases estão envolvidas nos processos de modificação celular que ocorre durante o crescimento e a morfogênese do fungo (ZEKOVIC et al, 2005).

Nas últimas décadas estes polímeros vêm recebendo atenção especial devido à sua bioatividade, com efeitos como imunomodulação, antitumoral, antiinflamatório, antimutagênico, hipocolesterolêmico e hipoglicemiante (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008). Mais de 1000 autores reportaram as propriedades imunomodulatórias das (1→3)-β-glucanas (BOHN e BEMILLER, 1995). Mas, as atividades biológicas das glucanas vão depender de alguns fatores como: estrutura primária, solubilidade, grau de ramificação e peso molecular (ZEKOVIC et al, 2005).

Alguns autores concluíram que um alto número de ramificações pode acelerar a afinidade das (1→3)-β-glucanas aos leucócitos e aumentar suas atividades biológicas (BOHN e BEMILLER, 1995; MUELLER et al, 2000). E de acordo com vários deles, a atividade biológica dos polissacarídeos é também dependente do seu tamanho; assim, polímeros com um alto peso molecular exibem maior afinidade de ligação e atividade biológica do que (1→3)-β-glucanas de baixo peso molecular (BOHN e BEMILLER, 1995; BORCHERS et al, 1999; MUELLER et al, 2000).

A conformação que as glucanas adquirem quando em solução parece ser um importante fator na sua ligação a receptores e para a sua atividade biológica (BOHN e BEMILLER, 1995; KULICKE et al, 1997; BORCHERS et al, 1999; MUELLER et al, 2000). Geralmente, as glucanas apresentam-se como uma espiral aleatória, como um polímero simples (hélice simples) ou como um complexo estável de três cordões poliméricos formando uma tripla-hélice (HASHIMOTO et al, 1997; KULICKE et al, 1997; WILLIAMS, 1997). Dados contraditórios existem a respeito da estrutura molecular específica relacionada à atividade biológica das glucanas. Alguns dados descrevem que tanto a lentinana quanto a esquizofilana são ativas somente quando estão em estrutura em simples hélice (SAITO et al, 1991). As estruturas em hélice simples e espiral aleatória da curdilana foram mais ativas do que as em hélices duplas e triplas (KATAOKA et al, 2002) e a estrutura em hélice simples da esquizofilana teve uma maior habilidade de produzir citocinas e óxido nítrico do que a em hélice tripla (OHNO et al, 1996; HASHIMOTO et al, 1997; HIRATA et al, 1998). Entretanto,

cabe ressaltar que apenas as (1→3)-β-D-glucanas com alto peso molecular parecem formar estruturas em tripla hélice (SAITO et al, 1991).

2.2.1 Glucanas e a Resposta Imune

Extratos de cogumelos retirados com água quente foram usados por séculos como remédios populares no Japão, China e Rússia. Hoje, eles são usados para estimulação do sistema imune em terapias específicas (KOGAN, 2000). Desde que algumas descobertas foram feitas, centenas de artigos e patentes têm descrito as propriedades das β-glucanas fúngicas (DI LUZIO, 1983). As (1→3)-β-glucanas pertencem a uma classe de drogas classificadas como ‘modificadores de respostas biológicas’ (BRMs), demonstrando que essas substâncias modificam a resposta biológica do organismo pela estimulação do seu sistema imunológico (DI LUZIO, 1983; BOHN e BEMILLER, 1995).

As atividades imunofarmacológicas mais importantes das β-glucanas incluem: aumento da resistência do hospedeiro às infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasíticas; efeitos anti-tumorais e prevenção da carcinogênese e efeito radioprotetor (DI LUZIO, 1983; BOHN e BEMILLER, 1995).

A ação protetora dessas glucanas tem sido descrita como imunomodulação não-específica devido ao grande número de vias imunes envolvidas, como ativação de macrófagos, estimulação de células T, estimulação do sistema retículo-endotelial; ativação das células ‘natural killer’, ativação das vias de complemento clássica e alternativa, e aumento da produção de anticorpos. Entre todos esses, a ativação de macrófagos parece ser o principal alvo das (1→3)-β-D-glucanas (CZOP, 1986). A glucana ao ativar os macrófagos faz com que seja aumentado o seu número e tamanho, estimulando a secreção de lisozima e do fator de necrose tumoral (TNF) e a fagocitose de antígenos (MEIRA et al, 1996).

Receptores para β-glucanas têm sido descritos em monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células ‘natural killer’, assim como em células não-imunes: células endoteliais, epiteliais de alvéolos e fibroblastos (BROWN e GORDON, 2003). Macrófagos humanos alveolares apresentam receptores fagocíticos específicos que são compatíveis com as β-glucanas presentes em fungos e leveduras. O receptor Dectina-1, uma glicoproteína transmembrana do tipo II, reconhece (1→3)-β-D-glucanas e/ou (1→6)-β-D-glucanas

resultando em uma variedade de respostas celulares incluindo fagocitose, endocitose e explosão oxidativa (BROWN e GORDON, 2003; GANTNER et al, 2003). A interação sinérgica entre os receptores Dectina-1 e TLRs pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), Proteínas Inflamatórias de Macrófagos 2 (MIP-2) e Interleucina-12 (IL-12) em macrófagos e células dendríticas (GANTNER et al, 2003).

2.2.2 Glucanas e a Ação Antitumoral

Estudos *in vitro* usando células normais e tumorais co-incubadas com glucanas têm mostrado que a glucana exerce um efeito citostático em células de sarcoma e melanoma, e um efeito proliferativo em células normais de baço e medula óssea (WILLIAMS et al, 1985).

Glucanas de leveduras e outras (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas fúngicas têm atividade antitumor significativa contra uma variedade de tumores espontâneos e transplantados experimentalmente em animais; e também têm sido testadas clinicamente em seres humanos (ZEKOVIC et al, 2005). O crescimento de tumores tem sido inibido e o tempo de sobrevivência do organismo aumentado, seja pela administração da glucana concomitantemente com o transplante do tumor ou pela administração intravenosa da glucana após o transplante de células tumorais (MAEDA et al, 1971; DI LUZIO et al, 1976; STITELER et al, 1978).

Um estudo com β -glucana de levedura demonstrou que macrófagos peritoneais de ratos tratados com esta glucana produziram uma resposta citotóxica significativa quando comparados com macrófagos normais (DI LUZIO et al, 1979). Estes estudos mostraram que esta β -glucana, se usada terapeuticamente, poderia inibir tanto metástase hepática quanto o crescimento primário de tumores e também aumentar a sobrevivência (DI LUZIO et al, 1980).

Acredita-se que a ultraestrutura das β -glucanas, como a conformação em tripla-hélice e a massa molecular, sejam importantes na sua atividade antitumoral (KISHIDA et al, 1992; OHNO et al, 1995). Recentemente, Giese e colaboradores (2008) confirmaram, através de testes em solução de NaOH, a conformação nativa da (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana

botriosferana em tripla-hélice, o que a torna interessante para o estudo de propriedades antitumorais.

2.2.3 Exemplos de β -glucanas

Muitos extratos de fungos, especialmente cogumelos, têm sido usados na medicina popular por possuírem propriedades antimutagênicas (SUGANO et al, 1982). O *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler contém componentes que exercem efeitos protetores contra a carcinogênese; o primeiro composto antitumoral extraído deste cogumelo foi um polissacarídeo de alto peso molecular denominado lentinana (IKEGAWA et al, 1968; CHIRAHA et al, 1970), uma (1 \rightarrow 3)- β -glucana que também apresentou a capacidade de aumentar a resistência do organismo contra infecções (GIESE et al, 2003).

Apesar do mecanismo antitumor da lentinana não estar completamente esclarecido, foi sugerido que esse polissacarídeo possui a capacidade de inibir a formação de tumores, principalmente, por agir como potencializador das defesas do organismo, ativando células imunes e induzindo a expressão genética de citocinas imunomodulatórias e seus receptores (BORCHERS et al, 1999; OOI e LIU, 2000). A lentinana não somente foi útil no tratamento de câncer como um imunopotenciador junto com drogas anticancerígenas, como também previniu o aumento de danos cromossômicos induzidos por drogas cancerígenas *in vivo* (HASEGAWA et al, 1989). Estudos mostraram claramente que soluções aquosas contendo lentinana apresentam atividade antimutagênica contra o efeito de agentes alquilantes que provocam danos no DNA (LIMA et al, 2001).

A esquizofilana (SPG) é um exopolissacarídeo secretado pelo fungo *Schizophyllum commune* (SUGAWARA et al, 1984). Estruturalmente é constituído por unidades repetidas de três ou quatro resíduos de D-glucopiranosídeo unidos por ligações β -(1 \rightarrow 3) e a cada unidade um D-glucopiranosídeo está unido por ligação β -(1 \rightarrow 6) formando a cadeia lateral (KOMATSU et al, 1969). Esse polissacarídeo é conhecido por apresentar potencial imunomodulador e atividade antitumoral (KIDD, 2000). Esta atividade foi observada primeiramente em tumores de murinos transplantados (KOMATSU et al, 1969), depois em tumores de ratos (MITANI et al, 1980) e também no carcinoma pulmonar de Lewis, como um modelo de metástase tumoral (YAMAMOTO et al, 1981).

A SPG é clinicamente usada como imunopotenciador em alguns casos de câncer e leucopenia. Estudos comprovaram que este EPS ativa fagócitos sanguíneos e também linfócitos, demonstrado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sangue, liberados pelo aumento da produção de citocininas pró-inflamatórias (KUBALA et al, 2003). A produção de citocininas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- α pelos leucócitos sanguíneos humanos representa um importante fator indicativo de resposta do sistema imunológico e é um marcador sensível de ativação leucocitária (KUBALA et al, 2002).

O alto potencial da SPG de estimular os fagócitos sanguíneos pode ser causado por vários fatores. Vários estudos sugerem que a bioatividade das β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas é relativo ao grau de ramificação da cadeia (BOHN e BEMILLER, 1995; BORCHERS et a, 1999; MUELLER et al, 2000). A frequência das ligações (1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 6) e a arquitetura das β -D-glucanas variam significativamente dependendo da espécie (SUZUKI et al, 2002). Foi observado que a SPG, com alta frequência de ramificação (1/3), exibiu atividade biológica mais intensa do que a carboximetilglucana que apresenta baixa frequência de ramificação (1/8) (KUBALA et al, 2003).

O fungo imperfeito *Sclerotium glaucanicum* secreta uma β -D-glucana conhecida como escleroglucana se corretamente cultivado (TAURHESIA e MCNEIL, 1994). Esta glucana é uma homoglucona solúvel em água que consiste de uma cadeia principal formada por 1,3- β -D-glucopiranosose unida com resíduos de 1,6- β -D-glucopiranosose a cada três moléculas de glucose (BIMCZOK et al, 2009). A estrutura primária desse polissacarídeo é muito parecida com a da esquizofilana (RAU, 2005). Esta glucana tem atraído consideravelmente a indústria devido à sua estrutura, peso molecular e propriedades (LECAUCHEUX et al, 1986; BRIGAND, 1993). A sua viscosidade em soluções aquosas não é alterada numa faixa de pH entre 1-12, em temperaturas até 135^o C e em alta salinidade (RAU, 2004), o que lhe confere diversas aplicações em várias áreas (WANG e MCNEIL, 1995). Em aplicações dermatológicas, as características anti-inflamatórias da escleroglucana tornam-a valiosa como um ingrediente ativo em protetores solares (HUBER et al, 2002). Também atua como modificadora de resposta biológica (SINGH et al, 1973), visto que possui efeitos imunomoduladores (WANG e MCNEIL, 1995). A administração da escleroglucana *in vivo* comprovadamente aumentou o número de macrófagos fagocitários (PRETUS et al, 1990), e *in vitro* estimulou células dendríticas, que consiste em um importante processo para estimular a inflamação e as respostas imunes adaptativas (BIMCZOK et al, 2009). A

escleroglucana tem apresentado atividade antineoplásica significativa, se mostrando melhor do que outras β -glucanas (JONG e DENOVIK, 1989). Este EPS pode ser encontrado comercialmente sob os nomes ActigumTM CS (Cargill Europe, BVBA, Brussel, Bélgica) e Tinocare® GL (Ciba Specialty Chemicals Inc., Basel, Suíça) (BIMCZOK et al, 2009).

2.3 ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE

Para que a seleção, a evolução e os processos adaptativos aconteçam nas espécies em geral, se faz necessário que ocorra a mutagênese: um processo intrínseco à vida e que permite a variabilidade genética (BORCHERS et al, 1999). Porém, essas mutações em excesso podem resultar em más formações, câncer e envelhecimento precoce, especialmente em função da carga de exposição aos agentes mutagênicos, podendo levar à extinção de espécies (AU et al, 2001).

O potencial mutagênico de xenobióticos pode ser avaliado através de ensaios *in vitro* desde que obedçam a critérios básicos como: sensibilidade para revelar com facilidade e precisão estatística, mesmo que seja um pequeno defeito 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).

Sistemas de células de mamíferos em cultura são amplamente utilizados para detectar agentes mutagênicos e antimutagênicos ambientais, em testes de curta duração (KURODA et al, 1992). Estes procedimentos estão sendo cada vez mais empregados para identificar não só agentes mutagênicos e antimutagênicos, como também para avaliar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico de compostos químicos (BROCKMAN et al, 1992); e também têm sido muito indicados devido às facilidades de administração das doses e manutenção (HEDDLE, 1982).

Testes com culturas de células de mamíferos apresentam várias vantagens, tais como: facilidade para padronizar as condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional) devido ao material ser relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e de comportamento; possibilidade de tratamento

das células em várias fases do ciclo celular; economia, rapidez e boa reprodutibilidade; organização dos cromossomos e do seu DNA igual às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991), além de eficiência estatística, uma vez que o número de células analisadas é maior em relação aos outros testes (ANGELI, 2007).

A avaliação da mutagenicidade e da genotoxicidade de um determinado composto envolve diferentes tipos de interações deste agente com o DNA e seus respectivos efeitos. Entre os diferentes ensaios, pode ser citado a observação de aductos no DNA, que avalia a capacidade de ligação entre o composto e o material genético; o ensaio do Cometa, através do qual se estima a capacidade do agente em causar lesões primárias no DNA; as mutações cromossômicas e o teste do micronúcleo que avaliam a capacidade do composto de quebrar o DNA (ANTUNES, 1997).

2.3.1 Ensaio Cometa

O ensaio do cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) é um método sensível para identificar quebras da fita do DNA (OSTLING e JOHANSON, 1984). Este vem atraindo atenção na última década devido à sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, velocidade e economia (ANGELI, 2007).

Após embeber células em agarose e depositá-las em uma lâmina, estas são lisadas com Triton X-100 e 2.5M NaCl para remover o citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando apenas seu DNA super-enovelado, na forma de nucleóides. Durante a eletroforese, o DNA é atraído para o ânodo, porém com movimentos significativos podem ser evidenciados as partes resultantes das quebras e uma cauda que se estende do nucleóide (ANGELI, 2007). Os cometas podem ser formados sob condições de eletroforese neutras ou básicas, entretanto, a variável mais utilizada apresenta um tratamento prévio à eletroforese com NaOH/EDTA a um pH superior a 13, desta forma permitindo o relaxamento da dupla hélice (SINGH et al, 1988). Após a eletroforese as lâminas são coradas com corantes fluorescentes que se intercalam ao DNA (Brometo de etídio, Laranja de acridina e outros) e podem então ser analisadas visualmente ou através da ajuda de “softwares” (ANGELI, 2007).

Em cada lâmina, as células são analisadas dentro de quatro classes (0, 1, 2 e 3) de acordo com o tamanho de sua cauda. Sendo, classe 0 sem danos, sem cauda; classe 1

pequeno dano, com uma cauda pequena e seu comprimento menor que o diâmetro da cabeça; classe 2 dano médio, o comprimento da cauda de 1 a 2 vezes maior do que o diâmetro da cabeça; classe 3 dano máximo, o comprimento da cauda mais de 2 vezes maior do que o diâmetro da cabeça.

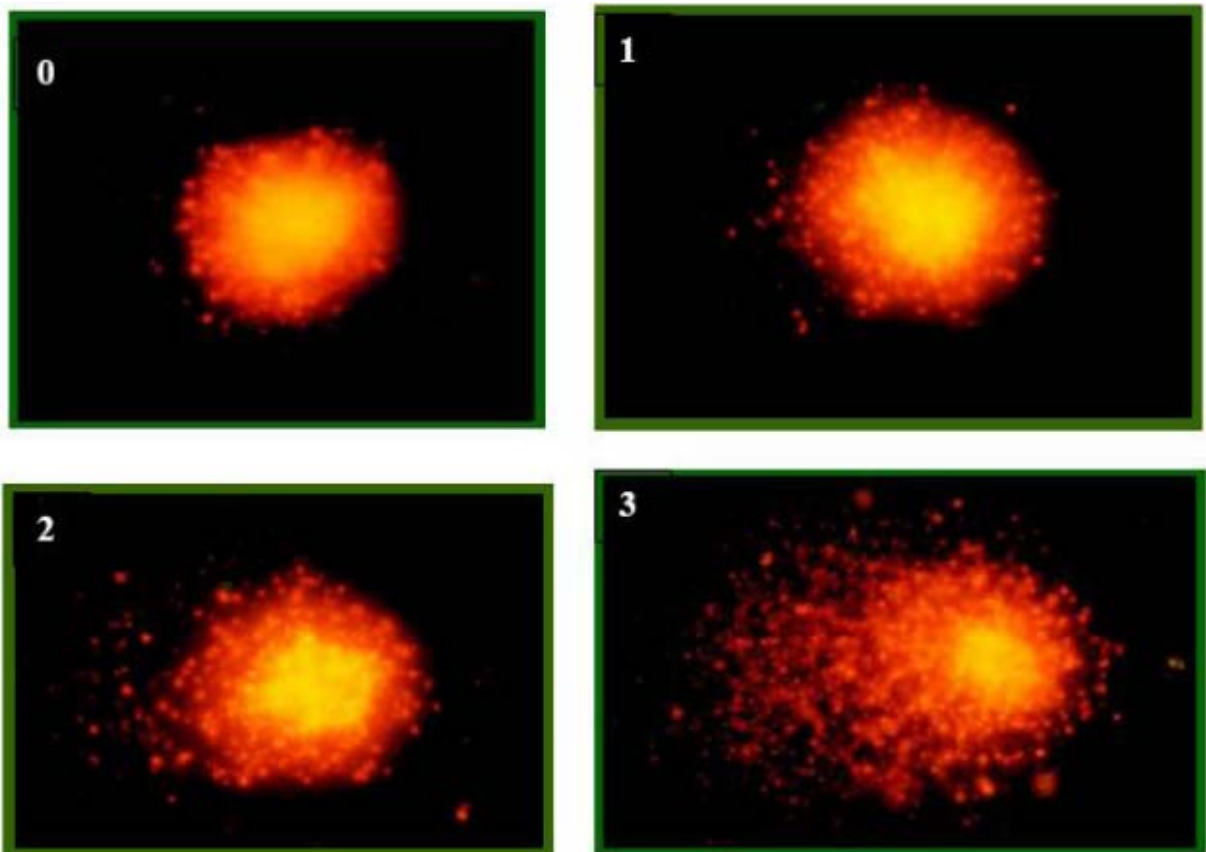


Figura 2 – Classes de danos no ensaio do cometa, sendo 0, 1, 2 e 3 as respectivas classes de danos.

Este teste é utilizado para detectar lesões do DNA que podem ser processadas e resultar em uma mutação. E, diferentemente do teste do micronúcleo, as lesões detectadas por este teste são passíveis de correção. E como este teste permite a visualização de danos e também do seu reparo em uma única célula, ele apresenta relevada importância na detecção de compostos genotóxicos (GONTIJO e TICE, 2003).

O ensaio do cometa tem sido utilizado em diversas áreas como a genética toxicológica, ecotoxicologia, reparo de DNA, apoptose, entre outras. Tendo em vista essa maleabilidade do teste, o mesmo tem tido uma crescente importância nos estudos de

mutagênese e carcinogênese, conseqüentemente para antimutagênese e anticarcinogênese (ANGELI, 2007).

2.3.2 Teste do Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpos contendo DNA localizados no citoplasma. Aparecem na telófase e são resultados de fragmentos acêntricos (originados de quebra isocromatídica ou cromatídica) ou de disfunções no fuso mitótico. 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, birrefringência ou ter mais do que 1/3 do tamanho do núcleo principal (MERSCH et al, 1996; KIRSCH-VOLDERS e FENECH, 2001).

Este teste é amplamente aceito como um teste de triagem para avaliação de anomalias cromossômicas. Foi primeiramente escrito por Schmid e colaboradores em 1975. Eles estabeleceram o teste do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos *in vivo*, sendo sua versão *in vitro* (HEDDLE, 1976), utilizando culturas de linfócitos periféricos humanos, proposta como um teste para a detecção de agentes carcinogênicos (MIRANDA, 2006).

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 na célula, e desta forma observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese. A análise é feita contabilizando as células binucleadas que apresentam micronúcleos, uma vez que, somente estas realmente apresentam danos causados pelo tratamento induzido (ANGELI, 2007).

2.4 ANTIMUTAGENICIDADE

O termo antimutagênese é utilizado para caracterizar determinados agentes que são capazes de reduzir, independentemente do mecanismo utilizado, a frequência de mutações, sejam induzidas ou espontâneas (WATERS et al, 1990). A antimutagênese pode ser classificada – de acordo com o seu mecanismo de ação – em dois grupos: desmutagênese, que atua inativando os agentes mutagênicos antes mesmo destes atingirem o núcleo e o material genético; e a bioantimutagênese, que vai atuar sobre os mecanismos de reparo do DNA, o que faz com que a taxa de mutações fixadas seja consideravelmente diminuída (KADA et al, 1992).

Substâncias antioxidantes podem funcionar como antimutagênicas, já que apresentam afinidade pelas ROS; estudos *in vitro* têm mostrado que estas substâncias inibem a formação das ROS ou as sequestram antes mesmo destas alcançarem a molécula de DNA, proporcionando, assim, uma proteção a esta macromolécula (RATTY, 1988; MORA et al, 1990; TERAO et al, 1994; VINSON et al, 1995).

Lampe (1999) verificou que dietas ricas em antioxidantes naturais apresentam associação com a diminuição do risco de desenvolvimento de algumas formas de cânceres.

2.5 DANOS OXIDATIVOS NO DNA

O metabolismo normal das células é muito bem estabelecido como fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) endógenas, e este processo celular, normalmente não-patogênico, eleva os níveis de danos oxidativos no DNA em tecidos normais. Certas atividades enzimáticas geram superóxidos e, numa via de explosão oxidativa, ROS são liberadas de células fagocíticas destinadas a destruir células infectadas com vírus ou bactérias, e podem afetar tecidos que ficam ao redor dessas células. As ROS podem ser geradas também pela ionização ou por radiação ultravioleta. Igualmente, certos produtos químicos exógenos podem reduzir compostos metabólicos celulares resultando na produção de elétrons que podem ser transferidos para o oxigênio molecular produzindo superóxidos ($O_2^{\cdot-}$). Independentemente de sua origem, as ROS podem interagir com as biomoléculas, como o DNA, e levar a modificações que geram sérias conseqüências para as células (COOKE et al, 2003).

Das espécies reativas de oxigênio, o mais reativo é o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) que reage com o DNA atacando as ligações duplas das bases nitrogenadas ou por retirada de um átomo de H do grupo metil da timina ou dos átomos de hidrogênio do carbono 2 da desoxirribose (SONNTAG, 1987). Quando este radical ataca a dupla ligação dos carbonos 5 e 6 das pirimidinas, a sua adição gera radicais secundários $\text{C5-OH}\cdot$ e $\text{C6-OH}\cdot$, enquanto a remoção do átomo de hidrogênio resulta na geração de um radical alil (Figura 2). Os radicais formados diferem entre si, de tal forma que o radical $\text{C5-OH}\cdot$ atua como agente redutor e o radical $\text{C6-OH}\cdot$ como agente oxidante (STEENKEN, 1987).

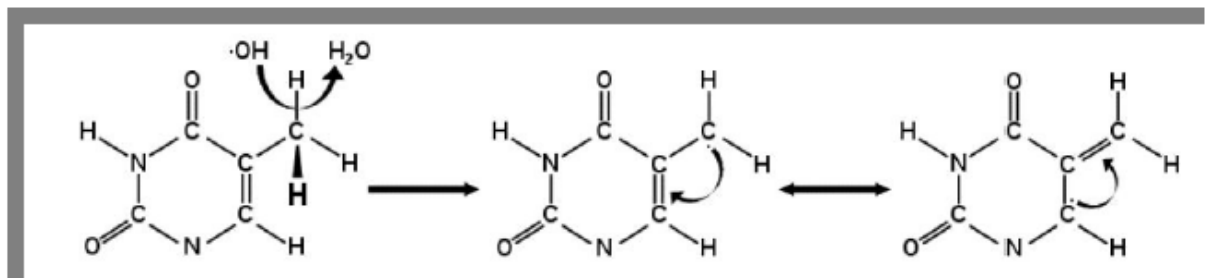


Figura 3 – Ataque eletrofílico do radical hidroxila ao grupo metil ligado ao carbono 5 da timina gerando um radical alil

Fonte: Mori (2008).

Nas purinas, o radical hidroxila reage por adição nos carbonos 4, 5 e 8, gerando radicais. O radical $\text{C4-OH}\cdot$ tem propriedades oxidantes, enquanto que o $\text{C5-OH}\cdot$ e o $\text{C8-OH}\cdot$ apresentam propriedades redutoras (VIEIRA e STEENKEN, 1990).

Porém, a interação das ROS com o DNA não apresenta apenas modificação nas bases nitrogenadas. A desoxirribose, por exemplo, é fragmentada pelo $\text{OH}\cdot$, rendendo em uma multiplicidade de produtos como a quebra da fita do DNA em condições alcalinas, modificações de base e açúcares e quebra de fitas duplas e simples (SONNTAG, 1987).

Vários estudos têm se preocupado em estabelecer uma relação entre os níveis de danos oxidativos no DNA e o câncer. Níveis elevados de danos tendem a aumentar como consequência de tumores com baixos níveis de enzimas antioxidantes e alta geração de ROS. Como resultado de níveis elevados de ROS, os fatores transcripcionais e seus genes

correspondentes são permanentemente ativados o que, juntamente com um DNA danificado, criam uma pressão seletiva para um fenótipo maligno como visto em cânceres (TOYOKUNI et al, 1995).

2.5.1 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DXR), também conhecido como adriamicina, é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclina, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetis* var. *caesius*, relatado como de uso corrente em oncologia humana e, em menor extensão, veterinária. Clinicamente, a DXR tem atividade significativa contra considerável número de tumores, incluindo alguns que são geralmente refratários a outros fármacos (SUSANECK, 1983). Porém, o uso da DXR pode ser complicado devido à presença de efeitos colaterais agudos e crônicos, que correspondem a, respectivamente, náuseas, vômitos, mielosupressão e arritmias; e cardiomiopatia e falência cardíaca (LEFRAK et al, 1973; SINGAL e ILISKOVIC, 1998). Muitos mecanismos contam para os efeitos dessa antraciclina, tanto nos termos da sua ação tumoral, quanto da toxicidade cardíaca e estes mecanismos envolvem um processo multifatorial complexo (QUILES et al, 2002).

Estudos têm comprovado que o estresse oxidativo e a produção de radicais livres estão envolvidos no modo de ação da DXR, tanto em termos da ação antitumoral quanto da cardiotoxicidade (GEWIRTZ, 1999; SINGAL et al, 2000). Além do mais, já foi reportado que a DXR provoca um dano oxidativo direto no DNA (FEINSTEIN et al, 1993) e gera peroxidação lipídica (QUILES et al, 1999a,b). Duas formas diferentes já foram descritas para a formação de radicais livres pela DXR. A primeira consiste na formação de um radical livre semiquinona pela ação de várias redutases NADPH-dependentes que produzem a redução de um elétron da doxorrubicina para a correspondente doxorrubicina semiquinona (OLSON e MUSHLIN, 1990; DE BEER et al, 2001). Na segunda, os radicais livres da DXR surgem de uma reação não-enzimática que envolve reações com o ferro. Por exemplo, Fe^{3+} reage com a DXR em uma reação redox onde o átomo de ferro aceita o elétron e um complexo radical Fe^{2+} -doxorrubicina é formado (DE BEER et al, 2001). Este complexo ferro-

DXR pode reduzir o oxigênio a peróxido de hidrogênio e a outras ROS (SINHA e POLLITI, 1990).

A enzima topoisomerase II parece ser um dos primeiros alvos de ação da DXR. As enzimas DNA topoisomerases têm um papel fundamental em praticamente todos os aspectos do metabolismo e da estrutura do DNA – replicação, transcrição, recombinação, reparação e construção da cromatina – modificando o seu estado topológico, através de quebra e posterior religação de suas fitas (BERGER, 1998). Essas enzimas são divididas em Topoisomerase I e II, onde a função da I é vinculada ao processo de transcrição gênica mediada pela RNA polimerase e a atividade da II é mais ampla, participando da mitose, no processo de condensação dos cromossomos e segregação das duplas hélices de DNA e na manutenção da estrutura da cromatina (LARSEN et al, 1998). A capacidade desta antraciclina de inibir a síntese de DNA tem sido proposta como um de seus mecanismos de ação (GEWIRTZ, 1999). E este mecanismo parece ocorrer pela intercalação do DNA e também inibição da atividade da polimerase (TANAKA e YOSHIDA, 1980).

2.5.2 Peróxido de Hidrogênio

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical OH^\bullet (Figura 3).

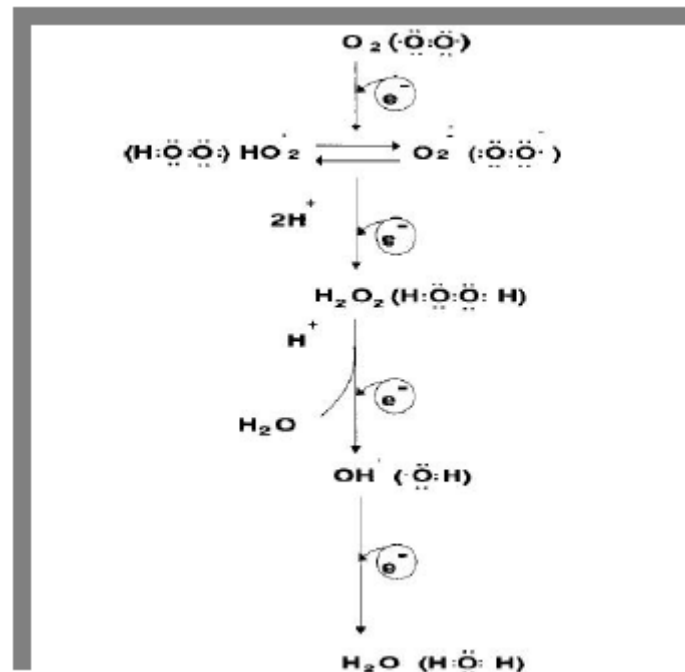


Figura 4 – Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias ROS são formadas no processo.

Fonte: Cohen (1989).

O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar membranas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{2+} (SCOTT et al, 1991). Assim, é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (EATON, 1991).

2.5.3 Benzopireno

O benzo[a]pireno (B[a]P) é um membro da classe dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), no qual a estrutura molecular contém dois ou mais anéis aromáticos fundidos e anéis adjacentes que dividem dois ou mais átomos de carbono (EWH, 1986). É um material sólido com ponto de fusão a 179°C ; é muito solúvel em solventes orgânicos aromáticos porém, tem solubilidade limitada em água, que varia de 0,2 a $6,1\mu\text{g/L}$ (NRCC, 1983; OME, 1985).

O B[a]P não é manufaturado e não apresenta uso industrial. É distribuído na natureza como uma consequência de sua formação durante a combustão de matéria orgânica.

Não há nenhuma relação quantitativa entre o B[a]P e outros PAHs, porém, se o B[a]P é encontrado, outros PAHs provavelmente também estão presentes. As principais fontes naturais de B[a]P são queimadas em florestas e erupções vulcânicas (ZEDECK, 1980), porém ações antropológicas também contribuem com a formação de B[a]P como a queima de combustíveis fósseis (STOKER et al, 1975; LEE et al, 1977).

As principais fontes de B[a]P nos alimentos são a absorção e deposição de partículas durante o processamento (alimentos defumados, vegetais folhosos), a pirólise de gorduras e a combustão incompleta do carvão (IARC, 1973). A água potável contribui de 0,1 a 0,3% no total de B[a]P ingerido, o ar contribui em cerca de 0,9% e os alimentos, a grande fonte, em 99% (WHO, 1984).

Evidências sugerem que as propriedades físico-químicas do B[a]P permitem sua rápida absorção e transporte através da circulação sistêmica. Os principais sítios de absorção são o trato gastrointestinal, devido à absorção pelos alimentos, e os pulmões, devido à inalação de aerossóis contaminados e matéria particulada. A distribuição para órgãos e tecidos ocorre em minutos (TYRER et al, 1981). A excreção ocorre através da urina como metabólitos solúveis em água, apesar de uma reciclagem enterohepática também ocorrer (excreção biliar e subsequente reabsorção pela circulação sistêmica). O benzo[a]pireno também atravessa a placenta e é distribuído na circulação do feto em desenvolvimento (TOMATIS, 1973). A natureza lipofílica do B[a]P faz com que ele seja depositado em tecidos adiposos, incluindo o tecido adiposo da mama e medula óssea (EWH, 1986).

O metabolismo do B[a]P ocorre em dois passos. O passo inicial, ou metabolismo de fase I, envolve a interação entre oxidases de função mista e a formação de diol-epóxidos, incluindo o trans-9,10-epóxi-7,8-diidrodiol B[a]P. Este diol-epóxido é considerado extremamente carcinogênico. É notável o fato de que o B[a]P (assim como os outros PAHs) é um potente indutor das oxidases de função mista e pode potencializar a sua toxicidade. A fase II do metabolismo envolve a conjugação dos metabólitos intermediários como a glutatona, sulfatos e ácidos mercaptúrico e glucurônico. Estes conjugados são mais solúveis em água, o que faz com que os rins rapidamente os excretem (BAKHE e VANE, 1977).

O benzo[a]pireno é carcinogênico em uma variedade de espécies e por um considerável número de rotas. O alvo preferido parece ser tecidos proliferativos do epitélio

gastrintestinal, da medula óssea e órgãos linfóides que interagem com o metabólito ativo do B[a]P na fase S do seu ciclo mitótico (SANTODONATO et al, 1981).

2.6 BOTRIOSFERANA

O gênero *Botryosphaeria* é amplamente reconhecido como endofítico de plantas, podendo causar diversas doenças em plantas de importância comercial (BIGGS, 1995); e tem sido descrito como lignolítico (BARBOSA et al, 1996), produzindo enzimas que degradam a parede lignificada da planta (DEKKER et al, 2001). *Botryosphaeria rhodina* é um fungo ascomiceto isolado de cancro de eucalipto (BARBOSA et al, 1996) que produz um EPS descrito como β -glucana (DEKKER et al, 2001).

A estrutura da glucana produzida pelo *B. rhodina* foi caracterizada como β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) e essa β -glucana foi denominada botriosferana. A botriosferana é constituída de uma cadeia principal de resíduos de glucose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3) e contém, aproximadamente, 22% de ramificações no carbono 6; as quais são constituídas por resíduos de glucose e gentiobiose (BARBOSA et al, 2003).

Estudos mostraram que o *Botryosphaeria rhodina* produz EPS em um número considerável de fontes de carbono. Nas fontes glucose, frutose, galactose, manose, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melão de cana de açúcar, todas as glucanas produzidas foram caracterizadas como sendo do tipo β (STELUTI et al, 2004). Quando produzida em glucose como fonte de carbono, a botriosferana apresenta 22% de ramificações (BARBOSA et al, 2003), porém quando produzida em sacarose comercial e frutose, esse número se altera para 21% e 31%, respectivamente, o que certamente deve proporcionar diferentes propriedades reológicas aos respectivos polímeros (CORRADI DA SILVA et al, 2005).

Modificações na estrutura química dos exopolissacarídeos têm chamado bastante atenção, especialmente a sulfatação. Isso porque a introdução de grupamentos sulfato aumenta a bioatividade das β -glucanas além de melhorar a solubilidade (MANTOVANI et al, 2008). Estudos em laboratório comprovaram que a sulfatação da botriosferana proporcionou atividade anticoagulante. Em comparação com a heparina, a botriosferana apresentou níveis muito bons de anticoagulação, quando comparados os tempos de tromboplastina, trombina e

pró-trombina. Por exemplo, na concentração de 10 μ g/ml de botriosferana produzida em frutose resulfatada, os resultados do teste de anticoagulação em plasma humano foram semelhantes à heparina na concentração de 3 μ g/ml. Excelente resultado comparando-se que, numa concentração apenas três vezes maior, a botriosferana sulfatada equiparou-se à heparina, até hoje conhecida como o melhor anticoagulante (MENDES et al, 2009).

O conhecimento das características químicas da botriosferana aponta para diversas atividades biológicas possíveis como antimutagenicidade, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, etc. Estudos prévios mostraram que além de não apresentar características mutagênicas, a botriosferana se comporta como antimutagênica reduzindo em até 82% a frequência de micronúcleos em células *in vivo* (MIRANDA et al, 2008). A botriosferana também apresentou efeito hipoglicemiante, reduzindo em 48% o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos (u. d.). Esses resultados biológicos abrem diversas portas para a continuidade do estudo das atividades biológicas da botriosferana; sendo este o enfoque principal deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir o exopolissacarídeo botriosferana utilizando sacarose comercial como única fonte de carbono e avaliar suas possíveis atividades citotóxicas, genotóxicas, mutagênicas e antimutagênicas em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79) e em células de hepatoma de rato (HTC); e os possíveis efeitos antioxidantes em sistema químico e microsomas hepáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir o exopolissacarídeo botriosferana através de cultivos submersos do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, utilizando sacarose comercial como única fonte de carbono. Extrair o EPS do meio de cultivo, liofilizá-lo e preparar diferentes concentrações para desenvolver os ensaios biológicos.
- Avaliar a atividade citotóxica e genotóxica *in vitro* do botriosferana em dois diferentes tipos celulares;
- Avaliar as possíveis atividades mutagênicas e antimutagênicas *in vitro* do botriosferana através do teste do Micronúcleo (MN) em dois diferentes tipos celulares;
- Avaliar a atividade antioxidante do botriosferana em sistema químico através do teste de Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) por quimiluminescência;
- Avaliar a atividade antioxidante do botriosferana através da Avaliação do Consumo de Oxigênio de Hemáceas induzida por *tert*-butil hidroperóxido utilizando a melhor concentração antimutagênica deste EPS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AGENTES QUÍMICOS

4.1.1 Doxorrubicina (DXR)

No presente estudo, a DXR (Adriblastina® RD – Pharmacia & Upjohn, Milan Italy, CAS no. 25316-40-9) foi dissolvida em água destilada até atingir uma concentração final de 0,75µg/mL de meio de cultivo e foi protegida da luz.

4.1.2 Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

No presente estudo, o peróxido de hidrogênio utilizado foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda (Depto de Ciências Biológicas – Unesp Campus Araraquara/SP) e foi dissolvido em água deionizada até atingir a concentração final de 1,70µg/mL e foi protegido da luz.

4.1.3 Benzo[a]pireno (B[a]P)

No presente estudo, o B[a]P (Sigma) foi dissolvido em DMSO até atingir uma concentração final de 2,5µg/mL de meio de cultivo e foi protegido da luz.

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Micro-organismo e Condições de Cultivo

O cultivo do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foi desenvolvido conforme descrito por Barbosa e colaboradores em 2003. O *Botryosphaeria rhodina* foi mantido em tubos inclinados contendo BDA (Ágar Batata Dextrose) a -4°C com transferências sucessivas a cada 3 meses. A partir dos tubos, o fungo foi transferido para placas de Petri que continham meio de Vogel acrescido de sais (VMSM), ágar (20g/L) e glucose (10g/L) e mantidos a 28°C por 120 horas. Em seguida, porções de hifas foram transferidas para Erlenmeyers modificados (Erlenmeyers contendo quatro inserções no fundo para aumento da oxigenação do fermentado) (125ml) contendo 25mL de VMSM e glucose a 0,5%, e cultivadas a 180rpm em agitador orbital do tipo “shaker”, por 48 horas, a 28°C . Os micélios obtidos nestes cultivos foram homogeneizados em “Blender”, previamente esterilizado, por 30 segundos à velocidade máxima. O homogenato de células foi então centrifugado e o *pellet* formado foi ressuspensionado em solução salina fisiológica previamente esterilizada. Esta solução foi diluída até se obter a sua leitura de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400nm, em espectrofotômetro. Aliquotas de 16mL desta solução de inóculo foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 2 litros contendo 400mL de VMSM e 5% (m/v) de sacarose comercial como fonte única de carbono.

4.2.2 Produção da β -glucana Botriosferana por *Botryosphaeria rhodina*

Os cultivos do *B. rhodina* nos frascos de Erlenmeyer (2L) foram mantidos sob agitação constante em agitador orbital, do tipo “Shaker”, a 180rpm por 72 horas a 28°C .

Após 72 horas, os cultivos foram interrompidos a 7000g e -4°C , por 15 minutos, e os sobrenadantes coletados foram tratados com 3 volumes de etanol absoluto e

deixados em câmara fria por 24 horas. Em seguida, o EPS foi ressolubilizado em água deionizada e dialisado contra água deionizada por 72 horas, com trocas sucessivas de água e então, congelado e liofilizado.

4.2.3 Preparo das soluções

Foi preparada uma solução de 3,0g/L de EPS liofilizado em salina fisiológica. Após a solubilização completa, foi determinado o pH 7,0. Em seguida, a solução foi autoclavada a 120 °C por 45 minutos sem pressão e transferida para frascos previamente autoclavados, com volume suficiente para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Uma amostra de cada solução foi reservada para as determinações de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) e de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois et al, 1956). Através destas dosagens foi verificada a concentração utilizada durante o experimento.

4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - TESTE DO MTT

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações. Para o ensaio com células V79, cerca de 2×10^4 células em 200µL de meio DMEM+Ham-F10 completo foram semeadas por poço em placas de 96 poços e incubadas por 15h a 37°C em estufa B.O.D. As células foram então expostas a 10 concentrações crescentes de botriosferana (7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 100,0; 150,0; 200,0; 300,0; 450,0 e 600,0µg/ml de meio) e incubadas por 3h a 37 °C, de acordo com a figura 4. Os meios foram então descartados e 100µl de meio incompleto + 10µl de MTT em PBS foram adicionado a cada poço e reincubados a 37 °C por 4 horas. A mistura foi então retirada cuidadosamente e 200µl de DMSO foi adicionado a cada poço. O teste foi protegido da luz e o tempo de pipetagem foi padronizado.

Para o experimento com as células HTC, cerca de 10^4 células em 200 μ l de meio DMEM+Ham-F12 completo foram semeadas por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa B.O.D. As células foram então expostas a 10 concentrações crescentes de botriosferana (7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 100,0; 150,0; 200,0; 300,0; 450,0 e 600,0 μ g/ml de meio) e incubadas por 24 horas a 37°C, também de acordo com a figura 4.

As absorvâncias das amostras foram analisadas no Laboratório de Imunologia Aplicada da Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano (Universidade Estadual de Londrina) em leitor de ELISA no comprimento de onda de 550 nm. Os dados apresentados indicam a % de atividade mitocondrial relativo ao controle negativo a partir de sete repetições.

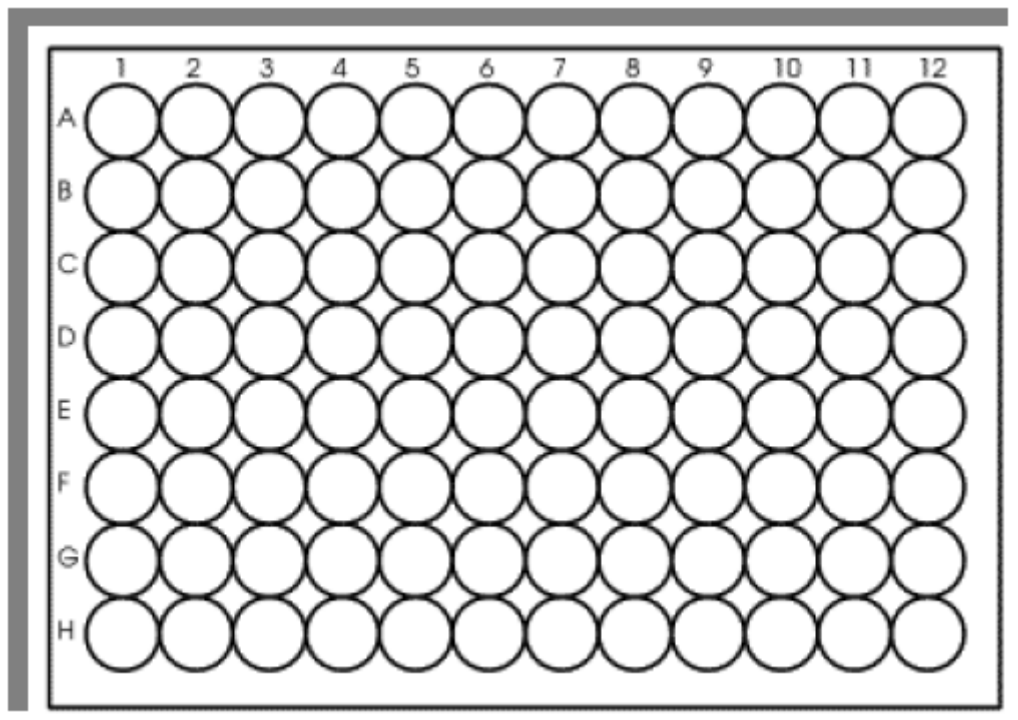


Figura 5 – Esquema representativo dos tratamentos realizados em placas de 96 poços para o teste do MTT: coluna 1) DMEM+Ham-F10 nas V79 ou DMEM+Ham-F-12 nas HTC (controle negativo); 2) EPS 7,5 μ g/mL; 3) EPS 15,0 μ g/mL; 4) EPS 30,0 μ g/mL; 5) EPS 60,0 μ g/mL; 6) EPS 100,0 μ g/mL; 7) EPS 150,0 μ g/mL; 8) EPS 200,0 μ g/mL; 9) EPS 300,0 μ g/mL; 10) EPS 450,0 μ g/mL; 11) EPS 600,0 μ g/mL. Na fileira A não havia células como um controle de contaminação e absorvância basal.

4.4 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a realização dos ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade foram utilizadas células de Fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) gentilmente cedidas pelo Profa. Dra. Sakamoto-Hojo (F.F.C.L. – Ribeirão Preto/USP) e células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) fornecidas pelo Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O cultivo de ambas as células foi realizado em frascos de cultura (25cm²) na forma de monocamada, em meio DMEM/Ham-F-10 (1:1) (Sigma) para a V79 e DMEM/Ham-F-12 (1:1) (Gibco) para a HTC, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e (penicilina 0,06g/L e estreptomicina 0,12g/L) e HEPES (2,38g/L) (Sigma). Os frascos foram mantidos em estufa de BOD à temperatura de 37°C. Antes da realização dos tratamentos, os frascos de cultura foram estabilizados em estufa B.O.D. a 37°C por um período de 24 horas para linhagem HTC e 15 horas para V79.

4.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese foi realizado para a avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica de três concentrações de botriosferana (7,5µg/mL, 30,0µg/mL e 100,0 µg/mL), escolhidas a partir do MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata usando as linhagens celulares V79 e HTC entre a 3^a e a 8^a passagem da cultura após o seu descongelamento. Para os experimentos, aproximadamente, 10⁶ células foram semeadas no meio de cultura e incubadas em estufa de BOD a 37°C por cerca de um ciclo celular (15 horas no caso da V79 e por 24 horas no caso de HTC) com a finalidade de permitir a aderência e estabilização das células no frasco de cultura.

Após a etapa de estabilização, as células foram lavadas com PBS e submetidas a meio de cultura sem suplementação de soro bovino fetal para o início dos protocolos de tratamento com botriosferana.

O protocolo de mutagenicidade, tanto para célula V79 quanto para célula HTC foi constituído por cinco grupos de tratamento: A) Grupo controle negativo: tratado com

50µL de PBS por 3 horas em V79 e 24 horas em HTC; B) Grupo controle positivo (2 para cada linhagem celular): tratado com 50µL de Doxorrubicina por 3 horas na linhagem V79; 50µL de benzo[a]pireno por 24 horas na linhagem HTC; 50µL de peróxido de hidrogênio por 20 minutos tanto em V79 quanto em HTC; C) Grupo experimental 1: tratado com 50µL da β-glucana botriosferana (7,5 µg/mL) por um período de 3 horas em V79 e 24 horas em HTC; D) Grupo experimental 2: tratado com 50µL da β-glucana botriosferana (30,0 µg/mL) por um período de 3 horas em V79 e 24 horas em HTC; E) Grupo experimental 3: tratado com 50µL da β-glucana botriosferana (100,0 µg/ml) por um período de 3 horas em V79 e 24 horas em HTC.

Para os ensaios de antimutagenicidade *in vitro* foram utilizadas células V79 e HTC submetidas a dois protocolos de tratamento: protocolo de pós-tratamento com o intuito de identificar atividade bioantimutagênica e protocolo de tratamento simultâneo, no qual se objetivou a confirmação dos efeitos desmutagênico e bioantimutagênico.

O pós-tratamento foi conduzido submetendo as células V79 e HTC a um tratamento inicial com um agente indutor de dano ao DNA (doxorrubicina, benzopireno e peróxido de hidrogênio), seguido de tratamento com a concentração de β-glucana botriosferana. O protocolo de tratamento-simultâneo foi realizado submetendo as células de V79 e HTC a um tratamento com uma solução da concentração de β-glucana botriosferana mais o agente indutor de dano ao DNA (1:1).

Foram realizados tratamentos com três diferentes concentrações da β-glucana botriosferana, sendo que para a célula V79 o tempo de tratamento foi de 3 horas de exposição e para célula HTC foi de 24 horas. Com relação aos agentes indutores de danos foram utilizados a doxorrubicina e o peróxido de hidrogênio para as células V79 e o benzo[a]pireno e o peróxido de hidrogênio para as células HTC. O tempo de tratamento com a doxorrubicina foi de 3 horas para as células V79 e 24 horas para a HTC. Para o peróxido de hidrogênio foi utilizado um tempo de tratamento de 20 minutos para ambas as linhagens celulares e para o benzo[a]pireno foi utilizado um tempo de 24 horas de exposição para as células HTC.

4.5.1 Indução de Células Binucleadas

Após cada tratamento as culturas foram lavadas duas vezes com 5mL de PBS, sendo que no final dos diferentes tratamentos foram acrescentados 5mL de meio de cultura completo + 50 μ L de Citocalasina B (Cyt-B), que permaneceu por 18 horas na cultura de V79 e 30 horas na cultura de HTC.

4.5.2 Obtenção de Células Micronucleadas

Para a fixação das células ao fim dos tratamentos, o conteúdo de cada frasco foi transferido para um tubo de centrífuga e os frascos lavados com 5mL de PBS. Logo em seguida, as células foram desprendidas com 0,5mL de Tripsina-EDTA e este composto foi inativado com meio de cultura previamente transferido para os tubos de centrífuga. Toda a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 900rpm. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* cuidadosamente desprendido do fundo do tubo. Posteriormente, as células foram tratadas com solução hipotônica (citrato de sódio a 1%) gelada, então centrifugadas e o seu sobrenadante descartado. Ao *pellet* foram adicionados 5mL de fixador (3 metanol:1 ácido acético) e duas gotas de formol a 1%, seguida de homogeneização. Depois os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 900rpm e o sobrenadante descartado.

4.5.3 Preparo de Lâmina de Célula HTC e V79

As lâminas foram preparadas e coradas com solução de Giemsa a 5% diluído em água destilada por 3 minutos. 1000 células binucleadas por experimento foram analisadas em microscópio óptico (Nikon) em aumento de 100x, assinalando as que continham de 1 a 3 micronúcleos, segundo os critérios de Titenko-Holland (1997).

4.5.4 Índice de Divisão Nuclear

Para determinar o Índice de Divisão Nuclear (IDN) foram contadas 500 células sendo consideradas as que continham de um a quatro núcleos. O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989):

$IDN = [M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)]/N$, onde: M_1 – células com 1 núcleo; M_2 – células com 2 núcleos; M_3 – células com 3 núcleos; M_4 – células com 4 núcleos; N – total de células viáveis.

4.5.5 Efeito Antimutagênico

A atividade antimutagênica será avaliada pela análise das porcentagens de redução de danos para cada um dos tratamentos com botriosferana, calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$Redução (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ célula com MN em A} - N^{\circ} \text{ célula com MN em B}}{N^{\circ} \text{ célula com MN em A} - N^{\circ} \text{ célula com MN em C}} \times 100$$

onde: A – controle positivo; B – tratamento e C – controle negativo.

4.6 ENSAIO DO COMETA

Os procedimentos reportados por Singh et al (1988) foram usados com algumas modificações, como descrito por Speit e Hartmann (1999). Previamente, uma fina lâmina de agarose NMP 1,5% foi colocada em uma lâmina e então 10 μ L de células V79, ressuspendidas em 120 μ L de agarose LMP a 37 $^{\circ}$ C, foram espalhadas na lâmina. Uma lamínula foi adicionada e a agarose foi colocada para solidificar a 4 $^{\circ}$ C por 15 minutos. A

lamínula foi então retirada delicadamente e a lâmina mergulhada em uma solução lisadora composta por 89mL de uma solução de estoque contendo NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM pH 10,0 e 1% de Lauril Sarcosinato de Sódio, mais 10mL de DMSO, 1mL de Triton X-100, com pH 10 a 4 °C por no mínimo 1 hora, protegida da luz. Ao final do período de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese contendo um tampão (NaOH 300mM e EDTA 1mM) com pH alto (13,0) e foram incubadas a 4 °C por 20 minutos para permitir o desnovelamento do DNA. Uma corrente de 25V (1,0V/cm, 300mA) foi aplicada por 20 minutos na cuba e logo após as lâminas foram submergidas em um tampão neutralizador (Tris HCl 0,4M pH 7,5) por 15 minutos e secadas à temperatura ambiente; foram então fixadas em etanol 100% por 10 minutos.

As lâminas ficaram “overnight” na geladeira e então foram cobertas com 20mg/mL de brometo de etídio e então cobertas com uma lamínula. Os nucleóides foram imediatamente evidenciados usando um microscópio de fluorescência Nikon em 400x com um filtro de excitação de 515-560nm e um filtro de 590nm como barreira.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As médias obtidas nos experimentos do MTT foram calculadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis.

As médias obtidas nos experimentos do micronúcleo e do ensaio do cometa foram calculadas e submetidas à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Para determinar a capacidade antioxidante total, a técnica utilizada foi a descrita por Ghiselli e colaboradores (1995), onde os níveis de antioxidantes totais são mensurados, principalmente antioxidantes de baixo peso molecular. Neste método, o 2,2'-azo-

bis (ABAP), um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e medidos em um luminômetro (Turner Designs TD 20/20). A adição de antioxidantes inibe a emissão por tempo determinado, portanto, utilizamos um padrão antioxidante, o Trolox (análogo da vitamina E hidrossolúvel).

Primeiramente, os reagentes foram pesados e diluídos da seguinte maneira: 54,24mg de ABAP foram diluídos em 1ml de água destilada e colocado no gelo; 2,5mg de Trolox foram diluídos em 5ml de tampão glicina 0,1M pH 8,6 gelado, e após completa diluição esta solução foi novamente diluída em tampão glicina gelado em uma proporção de 1:1000; e, por fim, 3,98mg de luminol foram diluídos em 250 μ L de KOH 1M e a esta solução foram adicionados 9750 μ L de tampão glicina, esta solução foi diluída novamente em tampão glicina em uma proporção 1:10. Um béquer com tampão glicina foi colocado em banho-maria a 37^o C.

Após o preparo dos reagentes, foram realizadas as leituras no luminômetro. A primeira leitura foi o do ABAP, onde no microtubo foram adicionados 900 μ L de tampão glicina do banho, 50 μ L de luminol e 50 μ L de ABAP. A segunda leitura foi a de Trolox, 830 μ L de tampão glicina do banho foi adicionado no microtubo, mais 70 μ L de trolox, 50 μ L de luminol e 50 μ L de ABAP. E por fim, foram realizadas as leituras da botriosferana.

A botriosferana foi mensurada em diferentes concentrações, sendo elas: 7,5, 30, 100, 200 e 300 μ g/mL. A análise realizada foi qualitativa, portanto o resultado foi expresso em URL (Unidade Relativa de Luz) e todas as leituras realizadas em triplicata.

4.9 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO DE HEMÁCEAS

Para avaliar a atividade protetora da botriosferana em membranas biológicas será realizado o teste de consumo de oxigênio de hemáceas induzido por *tert*-butil peróxido (LISSIE et al, 1986). Este ensaio baseia-se na medida da quantidade de oxigênio que é consumido pela célula depois da estimulação de sua membrana com o *tert*-butil peróxido. Quanto maior o consumo, maior a susceptibilidade da membrana ao dano oxidativo que pode ser provocado por esse formador de ROS. Avalia-se também o tempo de indução (T-ind) que é o tempo entre a adição do *tert*-butil peróxido na reação e o início do consumo de O₂.

O T-ind é diretamente relacionado com a capacidade antioxidante intracelular, enquanto que o consumo de O₂ é diretamente relacionado com a susceptibilidade do eritrócito em sofrer lipoperoxidação induzida pelo tert-butil peróxido (BAINY et al, 1996), uma vez que o aumento do consumo de O₂ inicia-se apenas após a exaustão dos mecanismos antioxidantes (VIDELA et al, 1984; LISSIE et al, 1986).

Considerando que as hemáceas maduras são células anucleadas, portanto incapazes de sintetizar substâncias antioxidantes, este teste poderá mostrar a ação protetora direta da botriosferana sobre danos oxidativos de membranas biológicas. Os eritrócitos serão submetidos a três lavagens consecutivas com salina fisiológica (0,9%) para eliminar possíveis interferentes. Os ensaios serão realizados com suspensão de eritrócitos a 1% em tampão fosfato monobásico 10mM, pH 7,4 e NaCl 0,9% pré-incubados a 37 °C por 5 minutos. A suspensão será transferida para a câmara de respiração do oxímetro (Clark), e a reação será iniciada com a adição de 12µL de *tert*-butil hidroperóxido (concentração de 2mM).

O experimento foi dividido em 3 grupos: controle (suspensão de hemáceas + 2 mM de tert-butil peróxido); suspensão de hemáceas + 100µg/mL de botriosferana + 2mM de tert-butil peróxido, e suspensão de hemáceas pré-incubadas com 100µg/mL de botriosferana a 37 °C por 30 minutos + 2mM de tert-butil peróxido por 3 horas. As dosagens de cada grupo serão realizadas em sextuplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO A

***IN VITRO* EVALUATION OF MUTAGENICITY AND GENOTOXICITY OF BOTRYOSPHERAN IN V79 AND HTC CELL LINES**

**Leandra E. Kerche, Ilce M. S. Cólus, Maressa C. M. de Lima, Mateus
P. Mori, Mariana B. dos Reis, Robert F. H. Dekker, Aneli M. Barbosa**

Artigo a ser submetido ao periódico “Archives of Toxicology” com impacto 2,626.

IN VITRO EVALUATION OF MUTAGENICITY AND GENOTOXICITY OF BOTRYOSPHAERAN IN V79 AND HTC CELL LINES

Leandra E. Kerche^{a,b}, Ilce M. S. Cólus^b, Maressa C. M. de Lima^b, Mateus P. Mori^c, Mariana B. dos Reis^b, Robert F. H. Dekker^d, Aneli M. Barbosa^a

1 INTRODUCTION

Glucans are glucose polymers widely distributed in nature and classified as the type of the glucosidic bond [α , β] of the main chain [1]. β -glucans are the predominant exopolysaccharide (EPS) form found in fungi [2]. Lately, researchers have established that β -D-glucans, notably those of mixed β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) glucosidic linkages, are biological response modifiers (BRMs) as they have stimulating effects on the defense mechanism of the living organism [3, 4]. They stimulate mainly the immune system, including the enhancement of the host resistance to viral, bacterial, fungal and parasitic infections; antitumor effects and prevention of carcinogenesis; radioprotectivity; and immunoadjuvant effects, as well as increase of phagocytotic and proliferative activity of the reticuloendothelial system [5].

Botryosphaeran [6] is a well characterized (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by the ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* (isolate MAMB-05) [7]. This exopolysaccharide presents approximately 22% side branching on C6 which are formed by glucose and gentiobiose [6].

A better knowledge of the chemical characteristics of the botryosphaeran leads to diversified possible biological activities. Previous studies of our research group have shown that this EPS do not present any mutagenic characteristics and reduced up to 82% the frequency of micronucleated cells in peripheral blood of mice [8]. It also presented hypoglycemic effect slowing down to 48% the level of plasmatic glyucose in diabetic rats [unpublished data]. The botryosphaeran was also capable of reducing the DNA damage

^a Dept^o de Bioquímica e Biotecnologia – CCE, Universidade Estadual de Londrina, Brazil

^b Dept^o de Biologia Geral – CCB, Universidade Estadual de Londrina, Brazil

^c Dept^o de Bioquímica – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil

^d Biorefining Research Initiative, Lakehead University, Canada

caused by the antibiotic bleomycin in human lymphocytes [9], reinforcing the anticlastogenic activity of this β -glucan.

Since the first studies about the biological activities of the botryosphaeran needed *in vitro* complementation, the objective of this work was to evaluate *in vitro* its cytotoxicity and its capacity to generate primary lesions and strand breaks in the DNA of two cell lines, Chinese hamster lung fibroblasts (V79) and *Rattus norvegicus* hepatoma cell line (HTC).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism and Growth Conditions

The ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was cultivated as described by Barbosa et al. [10]. Potato agar dextrose was used to maintain the fungus in a temperature of 4°C with successive transfers every three months. On agar plates (Vogel minimal salts medium (VMSM[11]), 20g/L agar and 10g/L glucose), pre-inoculum was prepared from fungal mycelial mats and transferred to liquid medium (VMSM and 5g/L glucose) as previously described [6, 12]. Fungal cultures were grown in Erlenmeyer flasks containing VMSM and 50g/L commercial sucrose and left for 72 hours at 28°C in orbital shaker (180rpm).

2.2 Production of Botryosphaeran

After the cultivation, flasks were harvested by centrifugation (8000rpm/15min) to remove mycelium, and the supernatant collected and treated with three volumes of absolute ethanol and left at 4°C for 24 hours, and the resulting material (botryosphaeran) re-dissolved in water and dialyzed against de-ionized water for 60 hours. The dialysate was lyophilized and the dried material (EPS) was stored at -20°C.

2.3 Preparation of Botryosphaeran Solution and Analysis

Stock solution of botryosphaeran for biological assays was prepared at the concentration of 3g/L in isotonic saline solution and the pH was corrected for 7. Then the

solution was autoclaved at 121°C for 20 minutes. Aliquot of the EPS solution was kept for the determination of reducing and total sugars by the methods of Somogyi [13], and Dubois et al. [14], respectively, to confirm the concentration used during the cells experiments. From previous tests, three concentrations of botryosphaeran (7.5, 30.0 and 100.0µg/mL) were chosen to be used, starting from the mother concentration of 3g/L and considering the culture medium.

2.4 Chemical Agents

- *Doxorubicin (DXR)*: The doxorubicin was used in commercial formula: Adriblastin[®] RD (Pharmacia & Upjohn, Milan – Italy), that was diluted in de-ionized water at the concentration of 0.75µg/mL in culture medium.
- *Hydrogen peroxide (H₂O₂)*: The hydrogen peroxide was diluted in de-ionized water at the concentration of 1.70µg/mL in culture medium.
- *Benzo[a]pyrene (B[a]P)*: The benzo[a]pyrene (Sigma) was diluted in DMSO at the concentration of 2.5µg/mL in culture medium.

2.5 Cell Lines

The Chinese hamster lung fibroblast cell line (V79) was gently provided by Prof.^a Sakamoto-Hojo from FFCLRP - Universidade de São Paulo (USP). The *Rattus norvegicus* hepatoma cell line (HTC) was kindly provided by Prof. Mantovani from Universidade Estadual de Londrina (UEL). All the cell lines were stored in fetal bovine serum + 10% DMSO in liquid nitrogen until use.

The cells were grown in culture flasks (25cm²) in DMEM/Ham-F-10 (1:1) (Sigma) for V79 and DMEM/Ham-F-12 (1:1) (Gibco) for HTC, both supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco) and 0.06g/L penicillin and 0.12g/L streptomycin and 2.38g/L HEPES (Sigma). The flasks were kept in B.O.D. incubator (Fanem) at 37°C for 15 hours and 24 hours for V79 and HTC, respectively.

2.6 Cytotoxicity Assay

3,4,5-Dimethyl thiazol-2-yl 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), is a yellow dye which is converted into formazone, a violet compound by the activity of enzyme succinate dehydrogenase of mitochondria. Since the conversion takes place in living cells, the amount of formazone produced is directly correlated with the number of viable cells present. MTT assay was done according to Mosmann [15], with slightly modification. Briefly, cells (10,000/well in 100 μ L medium) were seeded in 96 well plate and allowed to adhere for 15 h for V79 and 24 h for HTC in B.O.D. (Fanem) at 37°C. Medium was aspirated and cells were exposed to 7.5, 15.0, 30.0, 60.0, 100.0, 150.0, 200.0, 300.0, 450.0 and 600.0 μ g/mL botryosphaeran and incubated for 3 hours for V79 and 24 h for HTC at 37°C. Then treatment concentrations were discarded and 100 μ L minimum medium + 10 μ L MTT (5mg/mL solution) in phosphate buffered saline (PBS) was added to each well and re-incubated for another 4h at 37°C.

The reaction mixture was carefully aspirated; 200 μ L DMSO was added to each well and mixed thoroughly. After 10min absorbance was read at 550nm, using a ELISA reader.

The untreated sets were also run parallel under the identical conditions and served as control.

2.7 Micronucleus test

Three completely independent experiments were performed for all the treatments, which were aimed to determine the mutagenic effects of the (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -glucan Botryosphaeran in V79 and HTC cells. All of the experiments were conducted using cells that were in the third to eighth passage in culture in our laboratory. A total of 10⁶ cells were seeded in flasks containing 5mL of complete culture medium, remained under these conditions for approximately two cell cycles (20h and 48h, respectively), washed with PBS and submitted to the different treatments.

In the mutagenicity experiments, six treatment groups were performed: positive controls (DXR and H₂O₂ for V79 cell line and B[a]P and H₂O₂ for HTC cell line), negative control (PBS) and three different concentrations of botryosphaeran (7.5, 30.0 and

100.0µg/mL). All treatments were performed for 3 hours in V79 cell line and 24 hours in HTC cell line in serum-free medium.

In this study, the technique utilized to examine binucleated cells for micronuclei *in vitro* was that described by Fenech and Morley [16].

After completing the treatments, the cells were washed twice with 5mL PBS, trypsinized with 0.5mL ATV (0.24% trypsin-0.02% Versene; Instituto Adolf Lutz, Brazil) and centrifuged for 5min at 900rpm. The pellet was then resuspended in chilled hypotonic solution (1% sodium citrate) together with one drop of 1% formaldehyde and carefully homogenized with a Pasteur pipette. This cell suspension centrifuged again for 5min at 900rpm and resuspended in 5mL of fixative, methanol/acetic acid (3:1 v/v). Next, the tubes were centrifuged for 5min, the supernatant discarded, and the cell suspension poured onto slides previously cleaned and covered with a film of chilled distilled water.

The slides were stained with 3% Giemsa diluted in phosphate buffer (0.06M Na₂HPO₄ and 0.06M KH₂PO₄, pH 6.8) for 3min, washed with distilled water, air-dried and kept at 4 °C until microscope analysis.

The induction of MN was determined in 1000 binucleated cells with the cytoplasm well preserved. In a blind test, using Nikon microscope, cells containing 1-3 micronuclei were scored. The criteria for the identification of MN was according to Fenech [17] and Titenko-Holland et al. [18].

2.8 Nuclear Division Index (NDI)

The nuclear division index (NDI) was determined in 500 cells analyzed by repetition, in a blind test. Cells with well preserved cytoplasm, containing 1-4 nucleus, were scored using a Nikon microscope.

The NDI was calculated according to Eastmond and Tucker [19] using the following formula:

$$NDI = \frac{[M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)]}{N}$$

where M_1 - M_4 is the number of cells with 1, 2, 3 and 4 nucleus, respectively; N is the total number of viable cells.

2.9 Comet Assay

The procedures described by Singh et al. [20] were adopted with minor modifications as detailed in Speit and Hatmann [21]. Briefly, a base layer of 1.5% NMP agarose was placed on a microscope slide and 10 μ L of the V79 or HTC test cells suspended in 120 μ L of 0.5% LMP agarose at 37°C, were spread on the base layer. A coverslip was added and the agarose was allowed to solidify at 4°C for 15 min, after which the coverslip was gently removed and the slide immersed in freshly made lysing solution composed of 89mL stock solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris pH 10.0 and 1% sodium lauryl sarcosine), 10mL DMSO, 1mL Triton X-100; pH 10.0 at 4°C for at least 1h, protected from light.

At the end of lysing period, slides were transferred to an electrophoresis box containing a high pH (13.0) buffer (300mM NaOH, 1mM EDTA) and incubated at 4°C for 20min to allow the DNA to unwind. A current of 25V (1.0V/cm, 300mA) was applied for 20min, after which, the slides were submerged in a neutralization buffer (0.4M Tris HCl, pH 7.5) for 15min, dried at room temperature and fixed in 100% ethanol for 10min.

The slides were stored overnight, briefly rinsed in distilled water, stained with 20mg/mL ethidium bromide and covered with a coverslip. The stained nucleoids were immediately evaluated at 400x magnification using a Nikon fluorescence microscope fitted with a 515-560nm excitation filter and a 500nm barrier filter.

For each treatment, the extent and distribution of DNA damage indicated by the Comet assay were evaluated by examining 100 randomly selected and non-overlapping cells on the slides (*i.e.* 300 cells per treatment).

On each slide, the cells were visually scored and allocated to one of four classes (0, 1, 2 and 3) according to the tail size as follows: class 0, undamaged, no tail; class 1, a short tail with a length smaller than the diameter of the head; class 2, tail length between 1 and 2 times the diameter of the head; and class 3, maximally damaged, with a long tail more than twice the diameter of the head. The few comets observed with no head and those with almost all DNA in the tail, or with a very wide tail, were excluded from the analysis since

they could represent dead cells [22]. The total score for 300 comets was obtained according to the formula of Manoharan and Banerjee [23] with modifications as showed bellow:

$$\text{Score} = (1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3)$$

where n = number of cells in each class analyzed. Thus, the total score could range from 0 to 300.

2.10 Statistical Analysis

The mean obtained in MTT test were calculated and determined using Kruskal-Wallis' test, under the significance of 95%.

The mean frequency of micronucleated cells and the NDIs were calculated based on the results of three independent experiments, and the statistically significant differences between control and treatment values were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test at the 95% confidence level.

The mean scores were calculated from three independent experiments for each treatment. The ANOVA test followed by the Tukey's test (95% confidence level) were used to compare the means of each treatment with their negative control to assess the genotoxicity.

3 RESULTS

3.1 Cytotoxicity Assay

In this work, the MTT results presented a maintenance in the mitochondrial activity of V79 cells showing, that way, that botryosphaeran do not present cell cytotoxicity in any of the ten concentrations tested in this cell line (Figure 1).

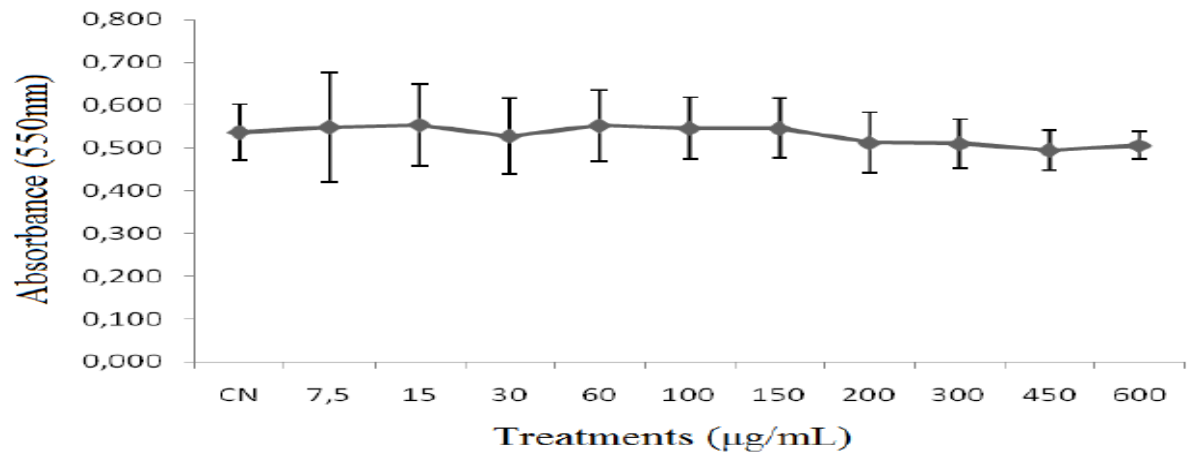


Figure 1 – Cytotoxicity in V79 cells treated with botryosphaeran.

The results from the MTT test with the HTC cell line also showed no cytotoxicity and two concentrations (300 and 450µg/mL) stimulated cell proliferation, demonstrated by an increase of the read absorbance. The highest concentration (600µg/mL), although, showed a tendency to cytostatic effect (Figure 2).

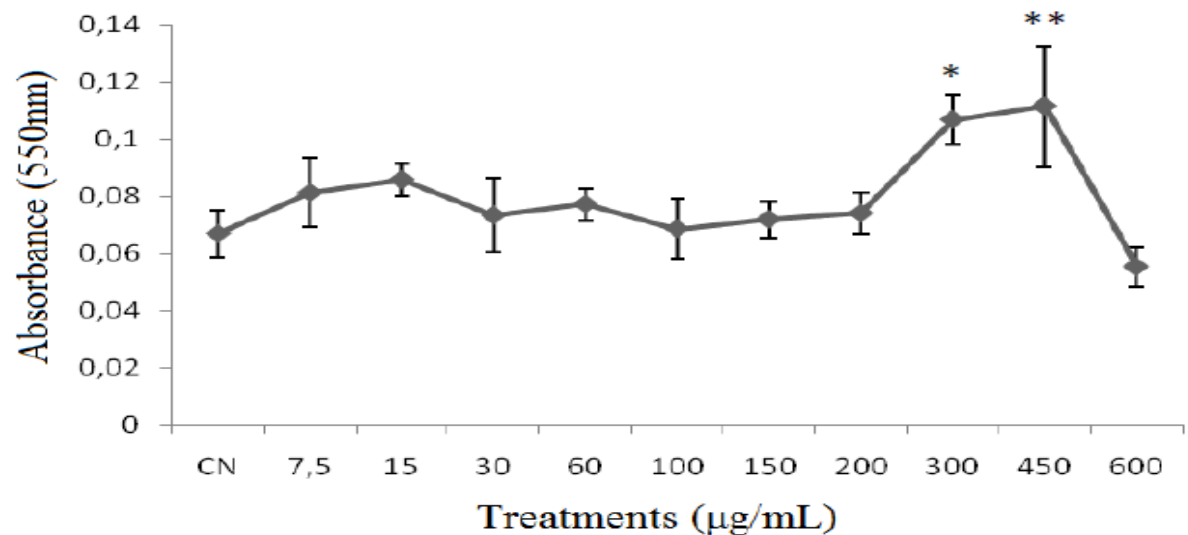


Figure 2 – Cytotoxicity in HTC cells treated with botryosphaeran.

* Differ statistically from negative control ($p < 0.05$).

** Differ statistically from negative control ($p < 0.001$).

These results obtained with the MTT test led to the three concentrations (7.5, 30.0 and 100.0µg/mL) chosen to perform micronucleus test and comet assay.

3.2 Micronucleus Test

Botryosphaeran did not show mutagenic activity in V79 and HTC cells *in vitro*, since the frequency of micronucleated cells observed after treatments of cells with three different concentrations of the EPS was not statistically different than that of negative control. The nuclear division index (NDI) for cells treated with the known mutagens or with botryosphaeran was statistically the same, showing that the cell cycle was kept intact (Table 1 and 2).

Table 1 – Frequency of micronucleated cells (MN cells) and nuclear division index (NDI) obtained in the determination of mutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective control in cultured V79 cells.

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Frequency of MN cells (1000 cells /experiment)				Nuclear Division Index (NDI) (500cells/experiment)			
	Experiments				Experiments			
	I	II	III	$X\pm\text{SD}$	I	II	III	$X\pm\text{SD}$
Control	2	1	3	2.0 ± 1.00	1.77	1.60	1.83	1.73 ± 0.12
DXR	14	10	11	$11.7\pm 2.08^*$	1.69	1.76	1.77	1.74 ± 0.04
H₂O₂	13	10	11	$11.3\pm 1.53^*$	1.93	1.90	1.80	1.92 ± 0.02
EPS 7.5	4	3	5	4.0 ± 1.00	1.73	1.79	1.63	1.72 ± 0.08
EPS 30.0	3	2	3	2.7 ± 0.68	1.74	1.60	1.78	1.71 ± 0.09
EPS 100.0	4	3	3	3.3 ± 0.58	1.75	1.85	1.79	1.80 ± 0.05

*Differ statistically from negative control ($p < 0.001$).

Table 2 – Frequency of micronucleated cells (MN cells) and nuclear division index (NDI) obtained in the determination of mutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective control in cultured HTC cells.

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Frequency of MN cells (1000 cells /experiment)				Nuclear Division Index (NDI) (500cells/experiment)			
	Experiments				Experiments			
	I	II	III	$\bar{X}\pm\text{SD}$	I	II	III	$\bar{X}\pm\text{SD}$
Control	3	3	0	2.0 \pm 1.73	1.78	1.76	1.74	1.76 \pm 0.02
B[a]P	16	15	17	16.0 \pm 1.00*	1.86	1.84	1.81	1.84 \pm 0.02
H₂O₂	16	19	13	16.0 \pm 3.00*	1.86	1.87	1.86	1.86 \pm 0.00
EPS 7.5	5	8	2	5.0 \pm 3.00	1.83	1.91	1.92	1.89 \pm 0.05
EPS 30.0	6	2	4	4.0 \pm 2.00	1.87	1.85	1.88	1.87 \pm 0.02
EPS 100.0	3	1	4	2.7 \pm 1.53	1.79	1.81	1.84	1.81 \pm 0.02

*Differ statistically from negative control ($p < 0.001$).

3.3 Comet Assay

The three concentrations of botryosphaeran tested (7.5, 30.0 and 100.0 $\mu\text{g/mL}$) showed no genotoxic effect on the V79 cell culture *in vitro*, since the means of the scores obtained were statistically similar to the negative control means (Table 3). In HTC cell line, botryosphaeran showed a genotoxicity of level 1 (Table 4).

Table 3 – Number of cells observed in each comet class of a total of 300 cells analyzed per treatment and their respective mean scores when assessing the genotoxicity of three different concentrations of botryosphaeran in V79 cells *in vitro*

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Comet Class				DC	Score	X \pm SD
	0	1	2	3			
PBS	96	4	0	0	4	4	6,7 \pm 3,05
	92	6	2	0	8	10	
	94	6	0	0	6	6	
DXR	18	23	32	27	82	168	161,0 \pm 9,64*
	21	31	25	23	79	150	
	19	21	36	24	81	165	
EPS 7.5	93	6	1	0	7	8	13,3 \pm 3,79
	88	9	3	0	12	15	
	89	10	2	0	12	14	
EPS 30.0	85	12	3	0	15	18	14,3 \pm 4,04
	87	11	2	0	13	15	
	91	8	1	0	9	10	
EPS 100.0	88	9	3	0	12	15	14,3 \pm 2,08
	91	7	1	1	9	12	
	88	9	2	1	12	16	

PBS: control; DXR: doxorubicin; EPS: botryosphaeran; SD: standard deviation; DC: damage cells.

*Differ statistically from negative control ($p < 0.001$).

Table 4 – Number of cells observed in each Comet class of a total of 300 cells analyzed per treatment and their respective mean scores when assessing the genotoxicity of three different concentrations of botryosphaeran in HTC cells *in vitro*

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Comet Class				DC	Score	$\bar{X}\pm\text{SD}$
	0	1	2	3			
PBS	96	4	0	0	4	4	3,0 \pm 1,00
	97	3	0	0	3	3	
	98	1	1	0	2	2	
B[a]P	19	21	25	35	81	176	178,7 \pm 9,29*
	17	16	28	39	83	189	
	23	15	30	32	77	171	
H ₂ O ₂	20	21	20	39	80	178	182,0 \pm 5,29*
	21	20	17	42	79	180	
	23	9	25	43	77	188	
EPS 7.5	96	3	1	0	4	6	7,3 \pm 4,16
	96	4	0	0	4	4	
	91	6	3	0	9	12	
EPS 30.0	92	7	1	0	8	9	12,3 \pm 3,06*
	89	10	0	1	11	13	
	90	5	5	0	10	15	
EPS 100.0	88	11	0	1	12	14	14,3 \pm 2,52*
	85	12	2	1	15	17	
	91	7	1	1	9	12	

PBS: control; B[a]P: benzo[a]pyrene; H₂O₂: hydrogen peroxide; EPS: botryosphaeran; SD: standard deviation; DC: damage cells.

*Differ statistically from negative control ($p < 0.001$).

4 DISCUSSION

In the cell wall of many living organisms – as cereals, plants, algae, fungi and yeast – can be found polysaccharides constituted of D-glucopyranosyl named glucans [24]. In fungi, (1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 6)- β -D-glucans are important components of the cell surface and these glucans are directly connected to the process of cell modifications that happens along the growth and morphogenesis of the fungi [24, 25].

In the last decades, these polymers have been receiving special attention due to its bioactivity such as immunomodulation, antitumoral, anti-inflammatory, antimutagenic, hypocholesterolemic and hypoglycemic effects [26].

In the present study, botryosphaeran was evaluated for cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity effects at three different concentrations in V79 and HTC cells *in vitro*, utilizing the MTT and micronucleous test, and comet assay, respectively.

In figure 2, it is shown an unexpected result for the MTT assay in HTC cells. This result shows an increase on the number of cells in the 300 and 450µg/mL concentrations. These results in a tumor cell line do not corroborate with the findings of Williams et al. [27], whose observed a cytostatic effect of a certain glucan in sarcoma and melanoma cells, although the highest concentration (600µg/mL) showed a tendency to this phenomenon. On the other hand, in V79 cells (Figure 1) the botryosphaeran did not interfere on the cell cycle and the cultures were maintained the same in all of the ten concentrations tested, which can be associated with the findings of Williams et al. [27] for the normal spleen and bone marrow cells.

These results could be related to the receptors on the HTC cell surface. Although none receptor for β-glucans in HTC cell line has been reported, others have been proven to be activated by this fungal exopolysaccharides. At a molecular level, two receptors for (1→3)-β-D-glucans have been characterized. The first one to be reported was the CR3 receptor that is highly expressed in immunological cells such as neutrophils, monocytes, NK cells, and in a minor significance in macrophages. The second one was the Dectin-1 and it is mainly expressed in macrophages mediating the phagocytosis of yeasts [28].

Through the results found in the cytotoxicity test, three distinct concentrations were determined to the achievement of the mutagenic and genotoxic tests. These concentrations were 7.5, 30.0 and 100.0µg/mL of medium.

Three DNA damage inductors were chosen to the realization of these tests, *Doxorubicin (DXR)*, *Hydrogen peroxide (H₂O₂)* and *Benzo[a]pyrene (B[a]P)*, all of them oxidant compounds. Although all of them provoke DNA damage through the generating of reactive oxygen species (ROS), they do it in different ways.

DXR presents two different ways of generating ROS. The first one consists in the generation of a semiquinone free radical through the action of several NADPH-dependent reductases which produces the reduction of a DXR electron to the correspondent semiquinone-DXR [29, 30]. The second one, the free radicals of DXR arise from a non-enzymatic reaction where the Fe³⁺ reacts with DXR in a redox reaction where a Fe²⁺-DXR

complex is formed. This complex can reduce oxygen to hydrogen peroxide and some ROS [30, 31].

H_2O_2 is not a free radical, for it does not have unpaired electrons in the last layer, but it participates in the generation of hydroxyl radicals (OH^\bullet) [32]. H_2O_2 has a long life and can trespass lipid membranes and its toxicity can be increased in the presence of iron [33].

B[a]P is far more dangerous after metabolism and the metabolism of B[a]P occurred in two steps. The first one, or phase I metabolism, involves the interaction between mixed-function oxydases and the generation of diol-epoxide, including trans-9,10-epoxy-7,8-dihydrodiol B[a]P which is very carcinogenic. The phase II metabolism involves the conjugation of the intermediated metabolites with the glutathione, sulfates and glucuronic and mercapturic acids, which are more soluble and easy to excrete [34].

Since the B[a]P is far more dangerous to the cell after metabolism, it was chosen as positive control for HTC cells, which are metabolizing cells.

Comparing to negative control and to these positive controls, botryosphaeran did not present any mutagenic effect on V79 and HTC cells (Tables 1 and 2). And this absence of mutagenic effects corroborated with the first findings *in vivo* in mice bone marrow cells and peripheral cell blood, where three doses of botryosphaeran (7.5, 15.0 and 30.0mg/kg body weight per day) were administrated along 15 days and did not raise significantly the number of micronuclei [8].

These findings are in agreement with those reported for two other fungal EPS schizophyllan [35] and scleroglucan [36], which are also (1→3;1→6)-β-D-glucans.

Schizophyllan is well known for its immunomodulation activity and antitumoral activity [37]; used nowadays in some cases of cancer and leucopenia [38].

Investigating the mutagenicity of certain compounds through *in vivo* or *in vitro* test make possible to evaluate the risk for human health, since a short phylogenetic distance is between the two systems [39]. Besides, the evaluation of mutagenicity and genotoxicity involves the different kinds of interactions between the agent in study with the DNA and its possible effects.

In the comet assay, genotoxicity of class 1 was found for HTC cell line for the concentrations of 30 and 100µg/mL (Table 2). In V79 cell line, no genotoxic effect was found for any of the concentrations tested (Table 1). The comet assay is used to detect

genomic lesions that after being processed could present a mutation result. Different from mutagenic tests, the DNA lesions observed in comet assay are capable of repair. And since no mutagenic effect was found for the botryosphaeran, the damage was not permanent.

Therefore, the results found in this paper showed that botryosphaeran did not present any mutagenic or cytotoxic effect in any of the concentrations tested. This findings show that botryosphaeran could be safety for human use and to achieve this more studies should be released. This work opened new perspectives for its biological applications since it complements the first *in vivo* results, showing that both *in vivo* and *in vitro* study conditions botryosphaeran presented non mutagenic activity.

Acknowledgements

This study was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, Brazil (CNPq), for financial support in the form of Master's degree scholarship for Leandra Kerche, and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (Capes) for financial support.

And it's also necessary to thank Prof. Dr. Varanda from Universidade Estadual Paulista (Araraquara, SP) for providing hydrogen peroxide for the study and Prof. Dr. Eiko Nakagawa Itano (Universidade Estadual de Londrina) for allowing the use of her laboratory for the MTT assay analysis.

REFERENCES

- [1] CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.
- [2] WILLIAMS, D. L. Overview of (1→3)- β -D-glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 247-250, 1997.
- [3] LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological responde modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101-114, 2006.
- [4] SLAMENOVÁ, D.; LABAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v. 198, p. 153-160, 2003.
- [5] KOGAN, G. (1-3, 1-6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. In: Atta-ur-Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 23, p. 107-151, 2000.
- [6] BARBOSA, A. M.; STELUTTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691-1698, 2003.
- [7] DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.
- [8] MIRANDA, C. C. B. O.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.
- [9] CÓLUS, I. M. S.; MORI, M. P.; KERCHE, L. E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. *In vitro* evaluation of mutagenic and protective effects of the β -glucan botryosphaeran in mammal's cell. **Annals of European Environmental Mutagen Society**, Florence, Italy, 2009.
- [10] BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.
- [11] HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, v. 111, p. 185-193, 1983.

- [12] STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOBI, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal Basic of Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.
- [13] SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- [14] DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBER, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28, p. 350-356, 1956.
- [15] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.
- [16] FENECH, M.; MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.
- [17] FENECH, M. The cytokinesis block-micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. **Mutation Research**, v. 285, p. 35-44, 1993.
- [18] TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 388, p. 85-95, 1997.
- [19] EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 13, p. 34-43, 1989.
- [20] SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175, p. 184-191, 1988.
- [21] SPEIT, G.; HATMANN, A. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. In: **Methods in Molecular Biology (HENDERSON, D. S. eds), 113 DNA-repair protocols: eukaryotic systems**. Human Press Inc., p. 203-212, 1999.
- [22] HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity of edible mushroom in a histidine-independent bacterial test system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, p. 159-165, 1997.
- [23] MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports** 9, P. 783-789, 1985.

- [24] ZEKOVIC, D. B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIC, M. M.; JAKOVLJEVIC, D.; MORA, C. Natural and modified (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 205-230, 2005.
- [25] ASADA, Y.; BUSHNELL, W. R.; OUCHI, S.; VANCE, C. P. Plant infection: The physiological and biochemical basis. **Japan Scientific Societies Press**, Tokyo and Springer Verlag, Berlin, 1982.
- [26] MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina Ciências Agrárias**, v. 29, p. 631-650, 2008.
- [27] WILLIAMS, D. L.; SHERWOOD, E. R.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; DI LUZIO, R. Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. **Hepatology**, v. 5, p. 198-206, 1985.
- [28] HONG, F.; YAN, J.; BARAN, J. T.; ALLENDORF, D. J.; HANSEN, L. D.; OSTROFF, D. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucan enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 797-803, 2004.
- [29] OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3076-3086, 1990.
- [30] DE BEER, E. L.; BOTTONE, A. E.; VOEST, E. E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, p. 1-11, 2001.
- [31] SINHA, B. K.; POLLITI, P. M. Anthracyclines. **Cancer Chemotherapy**, v. 11, p. 45-57, 1990.
- [32] COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, p. 918-931, 1989.
- [33] EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, p. 3-4, 1991.
- [34] BAKHE, Y. S.; VANE, J. R. In: Metabolic function of the lung. **Marcel Dekker, New York**, 1977.
- [35] SUGAWARA, I.; LEE, K. C.; WONG, M. Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and anti-tumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells. I. Characteristics of SPG-treated macrophages. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 16, p. 137-144, 1984.
- [36] TAURHESIA, S.; MCNEIL, B. Physicochemical factors affecting the formation of the biological response modifier scleroglucan. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 59, p. 157-163, 1994.

- [37] KIDD, P.M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 5, p. 4-27, 2000.
- [38] KUBALA, L.; RUZICKOVA, J.; NICKOVA, K.; SANDULA, J.; CIZ, M.; LOJEK, A. The effect of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2835-2840, 2003.
- [39] BUSK, L.; SJOSTROM, B.; AHLBORG, U.G. Effects of vitamin-A on cyclophosphamide mutagenicity *in vitro* (AMES test) and *in vivo* (mouse micronucleus test). **Food and chemical toxicology**, v. 22, p. 725-730, 1984.

5.2 ARTIGO B

**PROTECTIVE EFFECTS OF BOTRYOSPHAERAN, A (1→3; 1→6)-B-D-GLUCAN
FROM *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05, AGAINST OXIDANT
COMPOUNDS IN MAMMALIAN CELLS**

**Leandra E. Kerche, Ilce M. de S. Cólus, Maressa C. M. de Lima, Mateus P. Mori, Sara
S. Bernardes, Alessandra L. Cecchini, Robert F. H. Dekker, Aneli M. Barbosa**

Artigo a ser submetido ao periódico "Toxicology Letters" com impacto 3,249.

**PROTECTIVE EFFECTS OF BOTRYOSPHAERAN, A (1→3; 1→6)-B-D-GLUCAN
FROM *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05, AGAINST OXIDANT
COMPOUNDS IN MAMMALIAN CELLS**

**Leandra E. Kerche^{a,b}, Ilce M. de S. Cólus^b, Maressa C. M. de Lima^b, Mateus P. Mori^c,
Sara S. Bernardes^d, Alessandra L. Cecchini^d, Robert F. H. Dekker^e, Aneli M. Barbosa^a**

1 INTRODUCTION

Polysaccharides are natural macromolecules found in all living organism [1] and the ones produced by bacteria and fungi and found in the extracellular media are defined as exopolysaccharides (EPS) [2]. The most studied EPS are the glucans, and in fungi, (1→3; 1→6)-β-D-glucans are important components of the cell surface, playing a fundamental role on the morphological changes as well as in the stabilization of pathological and symbiotic associations with animals and higher plants [3].

Lentinan, a (1→3)-β-D-glucan produced by the mushroom *Lentinula edodes* (*Berk.*) *Pegler*, presents protective effects against carcinogenesis and also has shown the capacity to increase host resistance against infections [10, 11]. Researchers have shown that aqueous solutions of lentinan present antimutagenic effects against alkylating agents that can cause DNA damage [12]. The fungus *Schizophyllum commune* produces a (1→3; 1→6)-β-D-glucan known as schizophyllan that is already used as an immunopotentiator in some cases of cancer and leucopenia. Some studies have showed that this EPS activate blood phagocytes and lymphocytes by the increase in the production of the reactive oxygen species (ROS), released by the production of pro-inflammatory cytokines [13].

The ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 produces a family of (1→3; 1→6)-β-D-glucans named botryosphaerans when grown on different carbon

^a Dept^o de Bioquímica e Biotecnologia – CCE, Universidade Estadual de Londrina, Brazil

^b Dept^o de Biologia Geral – CCB, Universidade Estadual de Londrina, Brazil

^c Dept^o de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil

^d Dept^o de Patologia Geral - CCB, Universidade Estadual de Londrina, Brazil.

^e Biorefining Research Initiative, Lakehead University, Canada

sources [14]. This glucan is constituted by a main chain formed by (1→3)-β-D-glucosyl units and side-branched by (1→6)-β-D-glucopyranosyl and (1→6)-β-D-diglucopyranosyl in a frequency of approximately 22% [15]. Some studies have proven that *B. rhodina* can produce botryosphaeran in a considerable number of carbon sources. In almost all sources tested, including glucose, fructose, sucrose and commercial sucrose, the glucans produced were characterized as β type [16].

The first biological tests with botryosphaeran showed that this EPS in *in vivo* assays did not show mutagenic activity and behave as an antimutagenic compound, reducing up the frequency of micronucleous of the peripheral blood cells in 82% [17]. Lab studies with sulfated botryosphaeran have proven that in this condition this glucan presents an anticoagulant effect only three times lower than the heparin, known today as the best anticoagulant [18]. Since so little is known about the biological properties of this glucan, the aim of this work was to evaluate the protective effects of botryosphaeran in *in vitro* conditions using V79 and HTC cells against the DNA damages caused by doxorubicin, hydrogen peroxide and benzo[a]pyrene, and also evaluate the activity of botryosphaeran in human erythrocytes membrane damaged by *tert*-butyl hydroperoxide.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism and Growth Conditions

The ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was cultivated as described by Barbosa et al. [19]. Potato agar dextrose was used to maintain the fungus in a temperature of 4°C with successive transfers every three months. On agar plates (Vogel minimal salts medium (VMSM[20]), 20g/L agar and 10g/L glucose), pre-inoculum was prepared from fungal mycelial mats and transferred to liquid medium (VMSM and 5g/L glucose) as previously described [16, 21]. Fungal cultures were grown in Erlenmeyer flasks containing VMSM and 50g/L commercial sucrose and left for 72 hours at 28°C in orbital shaker (180rpm).

2.2 Production of Botryosphaeran

After the cultivation, flasks were harvested by centrifugation (8000rpm/15min) to remove mycelium, and the supernatant collected and treated with three volumes of absolute ethanol and left at 4°C for 24 hours, and the resulting material (botryosphaeran) re-dissolved in water and dialyzed against de-ionized water for 60 hours. The dialysate was lyophilized and the dried material (EPS) was stored at -20°C.

2.3 Preparation of Botryosphaeran Solution and Analysis

Stock solution of botryosphaeran for biological assays was prepared at the concentration of 3g/L in isotonic saline solution and the pH was corrected for 7. Then the solution was autoclaved at 121°C for 20 minutes. Aliquot of the EPS solution was kept for the determination of reducing and total sugars by the methods of Somogyi [22], and Dubois et al. [23], respectively, to confirm the concentration used during the cells experiments. From previous tests, three concentrations of botryosphaeran (7.5, 30.0 and 100.0µg/mL) were chosen to be used, starting from the mother concentration of 3g/L and considering the culture medium.

2.4 Chemical Agents

DNA damage in V79 cells was induced by *Doxorubicin* (DXR) (Adriblastina[®] RD – Pharmacia and Upjohn) at a concentration of 0.75µg/mL and also by *hydrogen peroxide* (H₂O₂) at a concentration of 1.70µg/mL. These solutions were dissolved in de-ionized water. In HTC cells, the DNA damage was induced by H₂O₂ at a concentration of 1.70µg/mL and also by *Benzo[a]pyrene* (B[a]P)(Sigma) at a concentration of 2.5µg/mL. Hydrogen peroxide and B[a]P was dissolved in de-ionized water and DMSO, respectively. All the solutions did not exceed 1% in culture.

For the human erythrocyte, according to the tests performed, Trolox, Luminol, 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) and *tert*-butyl hydroperoxide (All purchased from Sigma) were prepared in de-ionized water and used at a concentration of 1.85µg/mL, 1.77µg/mL, 2.71mg/mL and 0.18mg/mL, respectively.

2.5 Cell Lines

The Chinese hamster lung fibroblast cell line (V79) was gently provided by Prof.^a Dr.^a Sakamoto-Hojo from FFCLRP - Universidade de São Paulo (USP). The *Rattus norvegicus* hepatoma cell line (HTC) was kindly provided by Prof. Dr. Mantovani from Universidade Estadual de Londrina (UEL). All the cell lines were stored in foetal bovine serum + 10% DMSO in liquid nitrogen until use.

The cells were grown in culture flasks (25cm²) in DMEM/Ham-F-10 (1:1) (Sigma) for V79 and DMEM/Ham-F-12 (1:1) (Gibco) for HTC, both supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco) and 0.06g/L penicillin and 0.12g/L streptomycin and 2.38g/L HEPES (Sigma). The flasks were kept in B.O.D. incubator (Fanem) at 37°C for 15 hours and 24 hours for V79 and HTC, respectively.

Heparinized blood was obtained from healthy donors and every experiment was performed each day with fresh blood from the same donors.

2.6 Micronucleus Test

Three completely independent experiments were performed for all the treatments, which were aimed to determine the protective effects of the (1→3; 1→6)-β-glucan Botryosphaeran in V79 and HTC cells. All of the experiments were conducted using cells that were in the third to eighth passage in culture in our laboratory. A total of 10⁶ cells were seeded in flasks containing 5mL of complete culture medium, remained under these conditions for approximately two cell cycles (20 and 48h, respectively), washed with PBS and submitted to the different treatments.

In the antimutagenic experiments the following protocols were used: a) Simultaneous treatment: nine groups treated with three concentrations of botryosphaeran (7.5, 30.0 and 100.0µg/mL in culture) and co-treated with the two different positive controls. b) Post-treatment: nine groups treated with different positive controls for 3h (DXR), 20min (H₂O₂) and 24h (B[a]P), washed with PBS, and post-treated with three concentrations of the EPS for 3h. In each protocol to evaluate antimutagenicity also were established the groups positive controls and negative control. Cells were washed twice with PBS after each treatment that was performed in serum-free medium.

In this study, the technique utilized to examine binucleated cells for micronuclei *in vitro* was that described by Fenech and Morley [24].

After completing the treatments, the cells were washed twice with 5mL PBS, trypsinized with 0.5mL ATV (0.24% trypsin-0.02% Versene; Instituto Adolf Lutz, Brazil) and centrifuged for 5min at 900rpm. The pellet was then resuspended in chilled hypotonic solution (1% sodium citrate) together with one drop of 1% formaldehyde and carefully homogenized with a Pasteur pipette. This cell suspension centrifuged again for 5min at 900rpm and resuspended in 5mL of fixative, methanol/acetic acid (3:1 v/v). Next, the tubes were centrifuged for 5min, the supernatant discarded, and the cell suspension poured onto slides previously cleaned and covered with a film of chilled distilled water.

The slides were stained with 3% Giemsa diluted in phosphate buffer (0.06M Na₂HPO₄ and 0.06M KH₂PO₄, pH 6.8) for 3min, washed with distilled water, air-dried and kept at 4 °C until microscope analysis.

The induction of MN was determined in 1000 binucleated cells with the cytoplasm well preserved. In a blind test, using Nikon microscope, cells containing 1-3 micronuclei were scored. The criteria for the identification of MN was according to Fenech [25] and Titenko-Holland et al. [26].

In the antimutagenic experiments, the percent reduction in the number of cells with micronuclei in treatments with botryosphaeran that showed protective activity was calculated according to Manoharan and Banerjee [27] and Waters et al. [28] using the following formula:

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{\text{no. of cells with MN in A} - \text{no. of cells with MN in B}}{\text{no. of cells with MN in A} - \text{no. of cells with MN in C}}$$

where A was the group of cells treated with the respective positive control, B was the group of cells treated with botryosphaeran plus the positive control, and C was the negative control group.

2.7 Nuclear Division Index (NDI)

The nuclear division index (NDI) was determined in 500 cells analyzed by repetition, in a blind test. Cells with well preserved cytoplasm, containing 1-4 nucleus, were scored using a Nikon microscope.

The NDI was calculated according to Eastmond and Tucker [29] using the following formula:

$$NDI = \frac{[M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)]}{N}$$

where M_1 - M_4 is the number of cells with 1, 2, 3 and 4 nucleus, respectively; N is the total number of viable cells.

2.8 Measurement of Total Antioxidant Capacity (TRAP) of Botryosphaeran

Total antioxidant capacity of botryosphaeran was measured by chemiluminescence, in a reaction medium containing 2.71mg/mL 2,2'-azo-bis(2-amindinopropane) (AAPH) and 1.77µg/ml luminol. The addition of sample decreased the chemiluminescence to basal levels for a period (induction time) proportional to the antioxidant content of the sample until reaching the chemiluminescence regeneration level. The system was calibrated with 1.85µg/ml vitamin E analog Trolox [30].

2.9 Action of Botryosphaeran in Erythrocytes Membrane

For this test, heparinized blood was obtained from healthy donors who were non-smokers and were not receiving any pharmacological treatment. Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina approved the study protocol. Every experiment was performed with fresh blood that came from the same donors. Plasma and the buffy coat were removed after 5min centrifugation at 3500rpm/20°C, and the erythrocytes washed 2 times with 10 mM potassium phosphate-buffered saline, pH 7.4. The action of botryosphaeran in erythrocytes was assessed by healthy donors measuring oxygen uptake and induction time (Tind) following treatment with 0.18mg/mL *tert*-butyl hydroperoxide (TBH). To determine

the oxygen uptake and Tind in erythrocytes, erythrocytes was resuspended in the same buffer (1:99, v/v) and co-incubated with 100 µg/mL botryosphaeran (G-Ci) or incubated in the same concentration in a 37°C water-bath in the times 20, 60 or 180 minutes (G-20, G-60 and G-180, respectively). TBH induced oxygen uptake and Tind were measured with a Clark-type oxygen electrode at 37 °C. The induction time is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity, while oxygen uptake is an indirect measure of the susceptibility of erythrocyte membranes to lipid peroxidation elicited by TBH [31].

2.10 Statistical Analysis

The mean frequency of micronucleated cells and the NDIs were calculated based on the results of three independent experiments, and the statistically significant differences between control and treatment values were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test at the 95% confidence level.

For oxygen uptake and Tind, results are presented as means ± SEM of three independent experiments, with two tests each. The differences between responses were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's t-test at the 95% confidence level.

3 RESULTS

3.1 Micronucleus Test

Table 1 shows the results of the antimutagenicity experiments using two different protocols (simultaneous and post-treatment) in V79 cell line treated with doxorubicin and hydrogen peroxide. It is possible to see that all the combinations of the used concentrations of botryosphaeran were effective to reduce the DNA damage caused by mutagenic agents. Both protocols showed good results considering the percent reduction of DNA damage obtained to these cells.

The experiments with HTC cell line also showed a high decrease percentage of DNA damage caused by hydrogen peroxide and benzo[a]pyrene (Table 2).

For both cell types, the simultaneous treatment and the post-treatment showed similar results and the concentrations of 30.0 and 100.0 μ g/ml of botryosphaeran showed the best percent reduction of DNA damage (Tables 1 and 2).

Table 1 – Frequency of micronucleated cells (MN cells), nuclear division index (NDI) and % reduction of damage obtained in the determination of antimutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective controls in cultured V79 cells.

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Frequency of MN cells (1000 cells/experiment)										Nuclear division index (NDI) (500 cells/experiment)							
	Simultaneous Treatment					Post-Treatment					Simultaneous Treatment				Post-Treatment			
	Experiments			X \pm SD	%R	Experiments			X \pm SD	%R	Experiments			X \pm SD	Experiments			X \pm SD
	I	II	III			I	II	III			I	II	III		I	II	III	
Control	2	1	3	2.0 \pm 1.00 ^a	-	2	1	3	2.0 \pm 1.00 ^a	-	1.77	1.60	1.83	1.73 \pm 0.12	1.77	1.60	1.83	1.73 \pm 0.12
DXR	14	10	11	11.7 \pm 2.08 ^b	-	14	10	11	11.7 \pm 2.08 ^b	-	1.69	1.76	1.77	1.74 \pm 0.04	1.69	1.76	1.77	1.74 \pm 0.04
H₂O₂	13	10	11	11.3 \pm 1.53 ^b	-	13	10	11	11.3 \pm 1.53 ^b	-	1.93	1.90	1.80	1.88 \pm 0.07	1.93	1.90	1.80	1.88 \pm 0.07
EPS 7.5/DXR	7	2	2	3.7 \pm 2.89 ^a	83%	3	7	4	4.7 \pm 2.08 ^a	72%	1.76	1.83	1.81	1.80 \pm 0.04	1.74	1.72	1.78	1.75 \pm 0.03
EPS 30/DXR	5	4	2	3.7 \pm 1.53 ^a	90%	3	2	5	3.3 \pm 1.53 ^a	86%	1.80	1.72	1.82	1.80 \pm 0.03	1.73	1.68	1.76	1.72 \pm 0.04
EPS 100/DXR	3	4	2	3.0 \pm 1.00 ^a	90%	1	2	6	3.0 \pm 2.65 ^a	89%	1.60	1.81	1.74	1.72 \pm 0.11	1.73	1.64	1.73	1.70 \pm 0.05
EPS 7.5/H₂O₂	9	4	7	6.7 \pm 2.52 ^c	50%	8	4	6	6.0 \pm 2.00 ^c	58%	1.97	1.89	1.86	1.91 \pm 0.06	1.87	1.90	1.94	1.90 \pm 0.04
EPS 30/H₂O₂	6	5	4	5.0 \pm 1.00 ^a	68%	5	3	4	4.0 \pm 1.00 ^a	79%	1.66	1.90	1.92	1.83 \pm 0.14	1.83	1.89	1.84	1.85 \pm 0.03
EPS 100/H₂O₂	3	4	2	3.0 \pm 1.00 ^a	90%	3	4	2	3.0 \pm 1.00 ^a	89%	1.90	1.91	1.94	1.92 \pm 0.02	1.71	1.82	1.86	1.80 \pm 0.08

Same letter do not differ statistically. X \pm SD = mean \pm standard deviation. p<0.001 and p<0.05.

Table 2 – Frequency of micronucleated cells (MN cells), nuclear division index (NDI) and % reduction of damage obtained in the determination of antimutagenicity for three concentrations of botryosphaeran and respective controls in cultured HTC cells.

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Frequency of MN cells (1000 cells/experiment)										Nuclear division index (NDI) (500 cells/experiment)							
	Simultaneous Treatment					Post-Treatment					Simultaneous Treatment				Post-Treatment			
	Experiments			X \pm SD	%R	Experiments			X \pm SD	%R	Experiments			X \pm SD	Experiments			X \pm SD
	I	II	III			I	II	III			I	II	III		I	II	III	
Control	3	3	0	2.0 \pm 1.73 ^a	-	3	3	0	2.0 \pm 1.73 ^a	-	1.78	1.76	1.74	1.76 \pm 0.12	1.78	1.76	1.74	1.76 \pm 0.12
B[a]P	16	15	17	16.0 \pm 1.00 ^b	-	16	15	17	16.0 \pm 1.00 ^b	-	1.86	1.84	1.81	1.84 \pm 0.02	1.86	1.84	1.81	1.84 \pm 0.02
H ₂ O ₂	16	19	13	16.0 \pm 3.00 ^b	-	16	19	13	16.0 \pm 3.00 ^b	-	1.86	1.87	1.86	1.86 \pm 0.00	1.86	1.87	1.86	1.86 \pm 0.00
EPS 7.5/B[a]P	11	6	8	8.3 \pm 2.52 ^c	55%	3	5	4	4.0 \pm 1.00 ^a	85%	1.79	1.80	1.75	1.78 \pm 0.03	1.78	1.87	1.64	1.76 \pm 0.12
EPS 30/B[a]P	5	7	3	5.0 \pm 2.00 ^a	78%	2	5	2	3.0 \pm 1.73 ^a	92%	1.91	1.80	1.88	1.86 \pm 0.06	1.88	1.90	1.82	1.87 \pm 0.04
EPS 100/B[a]P	3	4	2	3.0 \pm 1.00 ^a	92%	3	4	1	2.7 \pm 1.53 ^a	92%	1.81	1.82	1.82	1.82 \pm 0.00	1.87	1.95	1.83	1.88 \pm 0.06
EPS 7.5/H ₂ O ₂	8	6	8	8.3 \pm 1.53 ^c	55%	10	6	5	7.0 \pm 2.64 ^c	64%	1.84	1.88	1.85	1.86 \pm 0.02	1.85	1.92	1.95	1.91 \pm 0.05
EPS 30/H ₂ O ₂	3	3	1	4.7 \pm 2.89 ^a	80%	3	6	4	4.3 \pm 1.53 ^a	83%	1.85	1.90	1.84	1.86 \pm 0.03	1.88	1.82	1.83	1.84 \pm 0.03
EPS 100/H ₂ O ₂	1	3	4	2.7 \pm 1.53 ^a	95%	2	4	5	3.7 \pm 1.53 ^a	87%	1.86	1.81	1.92	1.86 \pm 0.06	1.90	1.88	1.82	1.87 \pm 0.04

Same letter do not differ statistically. X \pm SD = mean \pm standard deviation. p<0.001 and p<0.05.

3.2 TRAP and Erythrocyte Catalase Activity

As seen in Figure 1, botryosphaeran (100 μ g/ml) did not inhibit the auto-oxidation of 2.71mg/mL AAPH. Other four concentrations of the EPS were tested (25, 50, 200 and 300 μ g/mL) and also did not present any effect (data not show).

Figure 2 shows that although the oxygen uptake by erythrocytes co-incubated and incubated with 100 μ g/mL botryosphaeran presented a decreased trend in relation for the control group, only co-incubated and incubated for 180 minutes were significant. The induction time (T_{ind}), that is directly related to the intracellular protective antioxidant capacity of erythrocytes, did not changed in the groups in relation for the control group.

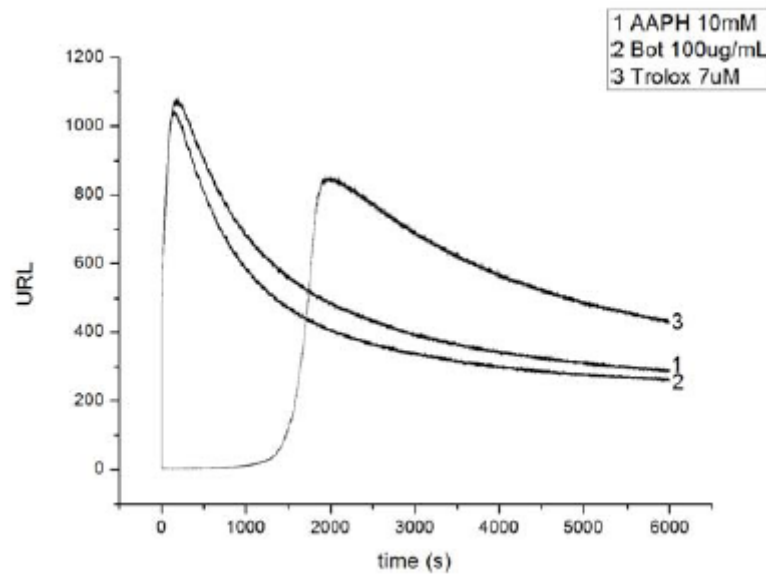
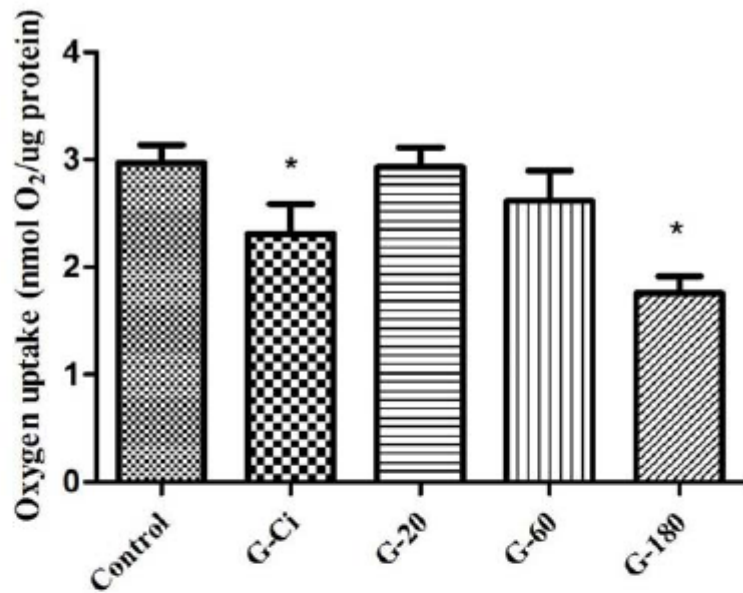


Figure 1 – Qualitative Total Antioxidant Capacity (TRAP) of botryosphaeran.

(A)



(B)

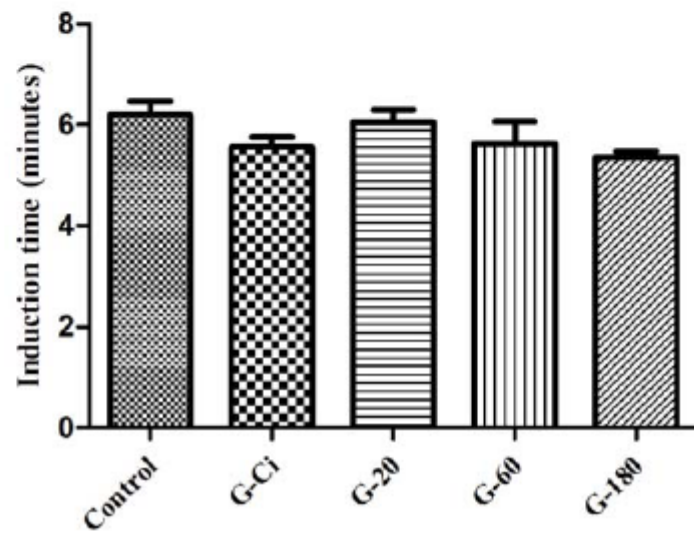


Figure 2 – Action of botryosphaeran in membrane erythrocytes: (A) Oxygen uptake of erythrocytes with botryosphaeran 100 µg/mL. G-Ci: co-incubation; G-20: incubation for 20 minutes; G-60: incubation for 60 minutes; G-180: incubation for 180 minutes. (B) Induction time of erythrocytes with botryosphaeran 100 µg/mL.

*p<0,05 compared to control group.

4 DISCUSSION

Nowadays, the medical advance carried to an increase of life's expectancy and to a large number of deaths caused by degenerative diseases as cancer [32]. The main factor that can carry out the carcinogenesis process is the chemical compounds and cellular process that can alter the structure of DNA resulting in a mutation that make possible the activation of proto-oncogenes or the suppression of the tumoral suppress genes [33]. It is well known that the prevention of tumors and other diseases related to cancer can be performed specially through the ingestion of protective factors that involves the strengthening of the immunological defenses by diet intervention [34]. Therefore, lately, there have been deep searches for natural substances that possess chemopreventive activity [35].

Botryosphaeran showed no mutagenic activity in previous studies (data preparation) and in the present study, the results were obtained using two different protocols for induce DNA damage and assess the chemoprevention through the analysis of micronuclei caused by three oxidant compounds and their combination with botryosphaeran in two different cellular types, Chinese hamster fibroblast cell line (V79) and *Rattus norvegicus* hepatoma cell line (HTC). The results show that botryosphaeran exert substantial protective effect against mutagenic agents that can be present in humans life.

The mechanisms of mutagenesis for oxidant agents involve the attack on the DNA double bonds or the withdrawal of one hydrogen atom of the methyl group of thymine radical or from the carbon 2 of deoxyribose. Notwithstanding, the ROS interaction with DNA does not only present changes in the nitrogenous bases, the deoxyribose can also be fragmented by the hydroxyl radical (OH^\bullet) yielding a multitude of products such as breaking the DNA strand under alkaline conditions, changes in bases and sugars and double and single strand break [36].

Many studies have concerned establishing a relationship among oxidative DNA damage and cancer. High damage levels tend to increase as a consequence of tumors with low levels of antioxidant enzymes and high generation of ROS. As a result of high levels of ROS, the transcriptional factors and its corresponding genes are permanently activated and, amongst a damaged DNA, create a selective pressure for a malignant phenotype as seen in cancers [37].

In this work, two of the three concentrations tested with botryosphaeran (30.0 and 100.0 µg/mL) showed excellent results. But the best result (95% reduction) were found in HTC cells with the highest concentration of botryosphaeran (100 µg/ml) with hydrogen peroxide in simultaneous treatment and benzo[a]pyrene in post-treatment (Table 1). It probably happened for the fact that β-glucans can work as a free radical scavenger [38], being able to bind to free radicals liberated by the introduction of H₂O₂ in the cell and to free radicals produced by the activation of B[a]p. B[a]P is far more dangerous to DNA when metabolized, and the activation of this compound by the enzymes of the P450 family generates free radicals that may interact damaging the DNA [39].

Oxygen uptake by erythrocytes is directly associated with the susceptibility of the erythrocyte membrane to undergo lipid peroxidation elicited by *tert*-butyl hydroperoxide and is proportional to previous oxidative stress experienced by the erythrocytes *in vivo*. The oxygen uptake and induction time tests showed that 100 µg/ml of botryosphaeran protects the membrane of erythrocytes against lipid peroxidation caused by 0.18 mg/mL BHT when incubated for 180 minutes, independent of intracellular antioxidant content in this cell. Therefore, TRAP test detects hydrosoluble antioxidants, since water-soluble radical initiator AAPH is added to generate free radicals in the aqueous phase [40], and this test indicated that botryosphaeran did not displays free radicals scavenger activity, not corroborating with the theory proposed by Chovartovicova et al. (1999) [38]. Studies have shown that (1→3)-β-glucans presents low antioxidant activity *in vitro* and important antioxidant activity *in vivo*, suggesting not directly action of these compounds. Probably β-glucans work as a protector of the cell membrane, perhaps chelating metal initiators of lipid peroxidation and also generators of hydroxyl radicals – the most mutagenic free radical – by Fenton reaction. However, the mechanism by which botryosphaeran exert DNA and lipoperoxidation protection needs further clarification. [41, 42]. This fact is in agreement with the results obtained with antimutagenicity and lipoperoxidation tested in this work.

We cannot ignore the fact that botryosphaeran could modulate enzymes inside the cell, changing the expression or the activity of these enzymes. This modulation could be supported by the activation of signaling pathways, expression of transcriptional factors and modulation of gene expression through the involvement of receptors in cell membrane [43]. Some studies have proven that polysaccharides extracted from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* show an *in vivo* inhibitory effect on the expression of isoenzymes of the P450 family [44, 45]. This cytochrome monooxygenase

system plays a central role in the metabolism of a wide variety of foreign compounds including plant metabolites, environmental pollutants, and drugs [46].

In V79 cells, the percent reduction of DNA damage was conformable in both simultaneous and post-treatment and the best results occurred in the highest concentration (Table 1). Associating the results from V79 and HTC we can infer that botryosphaeran presents desmutagenic and bioantimutagenic activity, since the protocol for post-treatment allows the inference of bioantimutagenic activity and the protocol for simultaneous treatment indicates bioantimutagenic as well as desmutagenic activity [35]. Biomutagenic activity happens when the compound tested induce enzymes that act on the process of mutagenesis or in the repair of the DNA damage decreasing the mutagenesis frequency [47]. On the other hand, desmutagenic process happens when cellular components capture the mutagenic agent or the compound tested inactivate it [47, 48]. In this study, the desmutagenic activity could be rethought since the TRAP test showed that botryosphaeran did not present chemical antioxidant property in *in vitro* system when compared to vitamin E analog trolox (Figure 1).

The data presented in this study shows that botryosphaeran is an interesting chemopreventive and oxidant protector compound, showing a high protection reducing in 90-95% DNA damage caused by the oxidant agents doxorubicin, hydrogen peroxide, benzo[a]pyrene, and protected erythrocytes cell membrane from damages caused by *tert*-butyl hydroperoxide.

Acknowledgements

This study was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, Brazil (CNPq), for financial support in the form of Master's degree scholarship for Leandra Kerche, and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (Capes) for financial support.

REFERENCES

- [1] GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial polysaccharides and polyesters. In: *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. New York: W. H. Freeman, 1995, p. 265-272.
- [2] SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.
- [3] ASADA, Y.; BUSHNELL, W. R.; OUCHI, S.; VANCE, C. P. Plant infection: The physiological and biochemical basis. **Japan Scientific Societies Press**, Tokyo and Springer Verlag, Berlin, 1982.
- [4] SLAMENOVÁ, D.; LABAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v. 198, p. 153-160, 2003.
- [5] MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, 30, p. 77-84, 1999.
- [6] SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, pg. 447-460, 2004.
- [7] VANHOOREN, P. T.; VANDAMME, E. J. L-fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 479-497, 1999.
- [8] WILLIAMS, D. L.; SHERWOOD, E. R.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; DI LUZIO, N. Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. **Hepatology**, 5, p. 198-206, 1985.
- [9] ZEKOVIC, D. B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIC, M. M.; JAKOVLJEVIC, D.; MORA, C. Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 205-230, 2005.
- [10] IKEGAWA, T.; NAKANISHI, M.; UEHARA, N.; CHIHARA, G.; FUKUOKA, F. Antitumor action of some basidiomycetes specially *Phellinus linteus*. **Journal of Cancer Research**, v. 59, p. 155-157, 1968.
- [11] GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Glucanases fúngicas: Produção e aplicação das β-(1→3) e β-(1→6) glucanases. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 97-104, 2003.
- [12] LIMA, P. L. A.; DELMANTO, R. D.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*. **Mutation Research**, v. 496, p. 2-32, 2001.

- [13] KUBALA, L.; RUZICKOVA, J.; NICKOVA, K.; SANDULA, J.; CIZ, M.; LOJEK, A. The effect of (1→3)- β -D-glucanas, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2835-2840, 2003.
- [14] VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L. Three exopolysaccharides of the β -(1→6)-glucan type and a β -(1→3; 1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.
- [15] BARBOSA, A. M.; STELUTTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, 338, p. 1691-1698, 2003.
- [16] STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOBI, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal Basic of Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.
- [17] MIRANDA, C. C. B. O.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.
- [18] MENDES, S. F.; SANTOS JR, O.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; SELVERIO, G. A.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; PEREIRA, M. S.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 305-309, 2009.
- [19] BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.
- [20] HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, v. 111, p. 185-193, 1983.
- [21] BARBOSA, A. M.; STELUTTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, 338, p. 1691-1698, 2003.
- [22] SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

- [23] DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBER, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28, p. 350-356, 1956.
- [24] FENECH, M.; MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.
- [25] FENECH, M. The cytokinesis block-micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. **Mutation Research**, v. 285, p. 35-44, 1993.
- [26] TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 388, p. 85-95, 1997.
- [27] MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogenesis in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International**, v. 9, p. 783-789, 1985.
- [28] WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, F. H.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57-85, 1990.
- [29] EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 13, p. 34-43, 1989.
- [30] REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M. L. G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, 107-117, 1996.
- [31] BORGES, C. L.; CECHINI, R.; TATAKIHARA, V. L. H.; MALVEZI, A. D.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. **Immunology Letters**, v. 123, p. 38-45, 2009.
- [32] DE FLORA, S.; QUAGLIA, A.; BENNICELLI, C.; VERCELLI, M. The epidemiological revolution of the 20th Century. **FASEBJ**, v. 19, p. 892-897, 2005.
- [33] FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.
- [34] DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.
- [35] OLIVEIRA, R. J.; RIBEIRO, L. R.; SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 1225-1233, 2006.

- [36] SOONTAG, V. **The Chemical Basis of Radiation Biology (TAYLOR AND FRANCIS eds)**, New York, 1987.
- [37] TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v. 358, p. 1-3, 1995.
- [38] CHOVARTOVICOVA, D.; MACHOVA, E. SANDULA, J.; KOGAN, G. Protective effect of the yeast glucomannan against cyclophosphamide-induced mutagenicity. **Mutation Research**, v. 444, p. 117-122, 1999.
- [39] BRIEDE, J. J.; GODSCHALK, R. W.; EMANS, M. T.; DE KOK, T. M.; VAN MAANEN, J.; VAN SCHOOTEN, F. J.; KLEINJANS, J. C. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. **Free Radical Research**, v. 38, p. 995-1002, 2004.
- [40] NIKI, E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1119S-24S, 1991.
- [41] KOGAN, G.; RAUKO, P.; MACHOVA, E. Fungal chitin-glucan derivatives exert protective or damage activity on plasmid DNA. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 931-935, 2003.
- [42] KRISKOVA, L.; DURACKOVAZ.; SANDULA, J.; SLAMENOVA, D.; SASINKOVA, V.; SIVONOVA, M.; KRAJCOVIC, J. Fungal β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan derivative exhibit high antioxidative and antimutagenic activity *in vitro*. **Anticancer Research**, v. 23, p. 2751-2756, 2003.
- [43] ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; ANGELI, J. L. F.; MANTOVANI, M. S. Protective effects of β -glucan extracted from barley against benzo[a]pyrene-induced DNA damage in hepatic cell HepG2. **Experimental and Toxicology**, v. 61, p. 83-89, 2009.
- [44] HASHIMOTO, T.; NONAKA, Y.; MINATO, K. Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* on the expression of cytochrome P450s in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 344, p. 610-614, 2002.
- [45] OKAMOTO, T.; KODOI, R.; NONAKA, Y. Lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) suppresses expression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. **Biofactors**, v. 21- 307-374, 2004.
- [46] GOTOH, O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 Family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analysis of amino acids and coding nucleotide sequences. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 83-90, 1992.
- [47] KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. **In: KLEKOWSKI, E. J. (Ed.), Environmental Mutagenesis and Plant Biology**, p. 137-151, 1982.
- [48] KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

CONCLUSÃO

Conclui-se, então, com esse trabalho que a botriosferana não apresenta mutagenicidade e nem citotoxicidade, além de ser um excelente quimopreventivo, protegendo as células V79 e HTC contra danos no DNA provocados pelos agentes oxidantes doxorrubicina, peróxido de hidrogênio e benzo[a]pireno.

A botriosferana também protegeu a membrana celular de eritrócitos humanos contra danos oxidativos provocados pelo *tert*-butil hidroperóxido.

Ainda há uma série de estudos que necessitam ser realizados para se complementar o conhecimento a respeito das propriedades biológicas deste EPS. Porém, com estes resultados *in vitro* complementando os resultados já publicados *in vivo* (MIRANDA et al, 2008) podemos nos assegurar que a botriosferana não apresenta mutagenicidade alguma para as células de mamíferos, além de apresentar altos índices antimutagênicos, reduzindo em grande grau (até 95%) os danos provocados no material genético destas mesmas células.

REFERÊNCIAS

- ANGELI, J. P. F. Avaliação do efeito quimioprotetor de β -glucanas de origem fúngica e vegetal no DNA de células eucarióticas. **Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina**, 2007, 97 pp.
- ANTUNES, L. M. G. Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. **Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, 1997, 97 pp.
- ASADA, Y.; BUSHNELL, W. R.; OUCHI, S.; VANCE, C. P. Plant infection: The physiological and biochemical basis. **Japan Scientific Societies Press**, Tokyo and Springer Verlag, Berlin, 1982.
- AU, W. W.; BADARY, O. A.; HEO, M. Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occupancy of Medicine**, v. 16, p. 345-357, 2001.
- BAINY, A. C. D.; SAITOB, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 151-162, 1996.
- BAKHE, Y. S.; VANE, J. R. In: Metabolic function of the lung. **Marcel Dekker, New York**, 1977.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; STELUTTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691-1698, 2003.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 29-42, 2004.
- BERGER, J. M. Structure of DNA topoisomerases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p. 3-18, 1998.
- BIMCZOK, D.; WRENGER, J.; SCHIRRMANN, T.; ROTHKÖTTER, H.-J.; WRAY, V.; RAU, U. Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 321-331, 2009.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3)- β -glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BORCHERS, A. T.; STERN, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumor and immunity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, p. 281-293, 1999.

- BRIGAND, B. Scleroglucan. **Industrial Gums (Whistler, R. L. and BeMiller, J. N., eds.)**, Academic Press, New York, p. 461-474, 1993.
- BROCKMAN, H. E.; STACK, H. F.; WATERS, M. D. Antimutagenicity profiles of some natural substances. **Mutation Research**, v. 267, p. 157-172, 1992.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.
- BUCHALA, A. J.; LEISOLA, M. Structure of the β -glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. **Carbohydrate Research**, v. 165, p. 146-149, 1987.
- CHEN, J; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, p. 635-652, 2007.
- CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, specially Lentinan, from *Lentinula edodes*. **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.
- COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, p. 918-931, 1989.
- CIMONS, M. Cancer rates decline as cancer funding increases. **Nature Medicine**, v. 4, p. 544, 1998.
- COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1195-1214, 2003.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; IZELI, M. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J.L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, G. V. J. Purification and structural characterization of (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 10-17, 2005.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.
- CZOP, J. K. The role of β -glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic-activation. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 5, p. 286-296, 1986.
- DE BEER, E. L.; BOTTONE, A. E.; VOEST, E. E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, p. 1-11, 2001.
- DE FLORA, S.; QUAGLIA, A.; BENNICELLI, C.; VERCELLI, M. The epidemiological revolution of the 20th Century. **FASEBJ**, v. 19, p. 892-897, 2005.

- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.
- DEKKER, R. F. H.; MIRANDA, C. C. B. O.; CÓLUS, I. M. S.; ZAIA, C. T. B. V.; CORRADI DA SILVA, M. L.; GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BARBOSA, A. M. Processo de produção de beta-glucana botriosferana, por via fermentativa e suas propriedades antimutagênicas e hipoglicemiantes. **World Intellectual Property Organization, PCT/BR2007/000334**, Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2007.
- DI LUZIO, N. R.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E.; COOK, J. A.; HOFFMANN, E. O. The employment of glucan and glucan activated macrophages in the enhancement of host resistance to malignancies in experimental animals. In: **The Macrophage and Neoplasia (Fink, M. A. ed.)**, Academic Press, New York, p. 181-198, 1976.
- DI LUZIO, N. R.; WILLIAMS, D. L.; MCNAMEE, R. B.; EDWARDS, B. F.; KITAHAMA, A. Comparative tumor inhibitory and antibacterial activity of soluble and particulate glucan. **International Journal of Cancer**, v. 24, p. 773-779, 1979.
- DI LUZIO, N. R.; WILLIAMS, D. L.; MCNAMEE, R. B.; MALSHET, V. G. Comparative evaluation of the tumor inhibitory and antibacterial activity of solubilized and particulate glucan. **Recent Results in Cancer Research**, v. 75, p. 165-172, 1980.
- DI LUZIO, N. R. Immunopharmacology of glucan – a broad-spectrum enhancer of host defense-mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, p. 344-347, 1983.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBER, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-induced agents using cytokinesis blocked human lymphocyte and an antikinetochore antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 13, p. 34-43, 1989.
- EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, p. 3-4, 1991.
- ENVIRONMENTAL AND WORKPLACE HEALTH. Benzo[a]pyrene. **Health Canada**, 1986.
- FENECH, M.; MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.
- FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.
- GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and toll-like receptor-2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 1107-1117, 2003.

GELDERBLOM, W. C.; GALENDO, D.; ABEL, S.; SWANEVELDER, S.; MARASAS, W. F. O.; WILD, C. P. Cancer initiation by fumonisin B1 in rat liver – role of cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 169, p. 127-137, 2001.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 727-741, 1999.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p.29-36, 1995.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. Glucanases fúngicas: Produção e aplicação das β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) glucanases. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 97-104, 2003.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SILVA, R. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 953-956, 2008.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial polysaccharides and polyesters. In: **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: W. H. Freeman, 1995, p. 265-272.

GOMAA, K.; KRAUS, J.; ROBkopf, F.; HOPER, H.; FRANZ, G. Antitumor and immunological activity of a β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-glucan from *Glomerella cingulata*. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 118, p. 136-140, 1992.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano do DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental (Ed. Ulbra)**, 2003.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 143-154, 1996.

HASEGAWA, J.; HOSOKAWA, M.; OKADA, F.; KOBAYASHI, H. Inhibition mitomycin C-induced sisterchromatid exchanges in mouse bone marrow cells by the immunopotentiators Krestin and Lentinan. **Mutation Research**, v. 226, p. 9-12, 1989.

HASHIMOTO, T.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Nitric Oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal β -glucans. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, p. 1006-1009, 1997.

HEDDLE, J. A. Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology. **New York, Academic Press**, 1982.

HIRATA, N.; TSUZUKI, A.; OHNO, N.; SAITA, M.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Cytokine synthesis of human monocytes stimulated by triple or single helical conformer of an antitumor (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan preparation, sonifilan. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 288, p. 403-413, 1998.

HUBER, K.; RAU, U.; MAIER, T.; SCHILLING, B. Scleroglucans and cosmetic compositions containing the new compounds. **US 6369217**, 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. **IARC**, Monograph 3, Lyon, 1973.

IKEGAWA, T.; NAKANISHI, M.; UEHARA, N.; CHIHARA, G.; FUKUOKA, F. Antitumor action of some basidiomycetes specially *Phellinus linteus*. **Journal of Cancer Research**, v. 59, p. 155-157, 1968.

JAGERSTAD, M.; SKOG, K. Genotoxicity of heat processed-foods. **Mutation Research**, v. 574, p. 156-172, 2005.

JONG, S. C.; DENOVICK, R. Antitumor and antiviral substances from fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 183-262, 1989.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. **In: Environmental Mutagenesis and Plant Biology (KLEKOWSKI, E. J. ed.)**. New York, p. 137-151, 1992.

KATAOKA, K.; MUTA, T.; YAMAZAKI, S.; TAKESHIGE, K. Activation of macrophages by linear (1→3)- β -D-glucans: Implication for the recognition of fungi by innate immunity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 36825-36831, 2002.

KIDD, P.M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 5, p. 4-27, 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, p. 51-58, 2001.

KISHIDA, E.; SONE, Y.; MISAKI, A. Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1→3)- β -D-glucans. **Carbohydrate Polymers**, v.17, p. 89-95, 1992.

KOGAN, G. (1-3, 1-6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. In: Attar-Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 23, p. 107-151, 2000.

KOMATSUO, N.; OKUBA, S.; KIKUMOTO, S.; SAITO, G.; SAGAI, S. Host-mediated antitumor action of Schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. **Gann**, v. 2, p. 137-144, 1969.

KRCMAR, P.; NOVOTNY, C.; MARAIS, M. F.; JOSELEAU, J. P. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, p. 61-64, 1999.

KUBALA, L.; CIZ, M.; VONDRACEK, J.; CERNY, J.; NEMEC, P.; STUDENIK, P.; CIZOVA, H.; LOJEK, A. Perioperative and postoperative course of cytokines and the

metabolic activity of neutrophils in human cardiac operations and heart transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 124, p. 1122-1129, 2002.

KUBALA, L.; RUZICKOVA, J.; NICKOVA, K.; SANDULA, J.; CIZ, M.; LOJEK, A. The effect of (1→3)-β-D-glucanas, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2835-2840, 2003.

KULICKE, W. M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)-β-D-glucanas. **Carbohydrate Research**, v. 297, p. 135-143, 1997.

KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

LAMPE, J. W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 475-490S, 1999.

LARSEN, A. K.; GOBERT, C.; GILBERT, C.; MARKOVITS, J.; BOJANOWSKI, K.; SKLADANOWSKI, A. DNA topoisomerases as repair enzymes: mechanism(s) of action and regulation by p 53. **Acta Biochimica Polonica**, v. 45, p. 535-544, 1998.

LAYTON, D. W.; BOGEN, K. T.; KNIZE, M. G.; HATCH, F. T.; JOHNSON, V. M.; FELTON, J. S. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 39-52, 1995.

LECAUCHEUX, D.; MUSTIERE, Y.; PANARAS, R. Molecular weight of scleroglucan and their microbial polysaccharides by size exclusion chromatography and low angle laser light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 6, p. 477-493, 1986.

LEE, M. L.; PRADO, G. P.; HITES, R. A. Source identification of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatographic mass spectrometry and high resolution mass spectrometry. **Biomedical Mass Spectrometry**, v. 4, p. 182-186, 1977.

LEFRAK, E. A.; PITHA, J.; ROSENHEIM, S.; GOTTLEIB, J. A. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer**, v. 32, p. 302-314, 1973.

LEVI, F.; LUCCHINI, F.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Cancer mortality in the European Union. **International Journal of Cancer**, v. 98, p. 636-637, 2002.

LIMA, P. L. A.; DELMANTO, R. D.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*. **Mutation Research**, v. 496, p. 23-32, 2001.

LISSI, E. R.; FRANS, J. C.; FERNANDES, V.; VIDELA, L. A. Effects of antioxidants and haemoglobin status on the *t*-butyl hydroperoxide-induced uptake by red blood cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 4, p. 447-454, 1986.

- LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 100, p. 776-781, 2003.
- MAEDA, Y. Y.; HAMURO, J.; CHIHARA, G. The mechanisms of action of antitumor polysaccharides. I. The effect of antilymphocyte serum on the antitumor activity of lentinan. **International Journal of Cancer**, v. 8, p. 41-46, 1971.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina Ciências Agrárias**, v. 29, p. 631-650, 2008.
- MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P. F.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. β -glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 658, p. 154-161, 2008.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 77-84, 1999.
- MEIRA, D. A.; PEREIRA, P. C. M.; MARCONDES MACHADO, J.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, B.; PELLEGRINO, J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERACOLLI, M. T. S.; CASTILHO, L. M.; THOMAZINI, I.; DASILVA, C. L.; FOSS, N. T.; CURTI, P. R. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 496-503, 1996.
- MENDES, S. F.; SANTOS JR, O.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; SELVERIO, G. A.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; PEREIRA, M. S.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 305-309, 2009.
- MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**, v. 371, p. 47-55, 1996.
- MIRANDA, C. C. B. O. Produção de Botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica. **Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina**, 2006, 186 pp.
- MIRANDA, C. C. B. O.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.
- MORA, A.; PAYÁ, M.; RIOS, J. L.; ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 793-797, 1990.
- MORI, M. P. Avaliação *in vitro* das atividades mutagênicas, antimutagênicas e modulação da viabilidade celular do exopolissacarídeo botriosferana. **Monografia – Universidade Estadual de Londrina**, 2008, 55 pp.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MUELLER, A.; RAPTIS, J.; RICE, P. J.; KALBFLEISCH, J. H.; SOUT, R. D.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. L. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v. 10, p. 339-346, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: formation, sources, fate and effects on the aquatic environment. **NRCC No. 18981, Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality**, 1983.

OHNO, N.; HASHIMOTO, T.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Conformation dependency of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by β -glucans in vitro. **Immunology Letters**, v. 52, p. 1-7, 1996.

OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3076-3086, 1990.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v. 123, p. 291-198, 1984.

PRETUS, H. A.; ENSLEY, H. E.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, P. L. Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 257, p. 500-510, 1991.

QUILES, J. L.; RAMÍREZ-TORTOSA, C.; HUERTAS, J. R.; IBÁÑEZ, S.; GÓMEZ, J. A.; BATTINO, M.; MATAIX, J. Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. **Biofactors**, v. 9, p. 331-336, 1999a.

QUILES, J. L. RAMÍREZ-TORTOSA, C.; IBÁÑEZ, S.; GONZÁLEZ, A.; DUTHIE, G. G.; HUERTAS, J. R.; MATAIX, J. Vitamin E supplementation increases the stability and the *in vivo* antioxidant capacity of refined olive oil. **Free Radical Research**, v. 31, p. 129-135, 1999b.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA, C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v. 180, p. 79-95, 2002.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **In: Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Revista Brasileira de Genética**, p. 107-112, 1991.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 39, p. 69-79, 1988.

- RAU, U. Glucans secreted by fungi. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 30-36, 2004.
- RAU, U. Schizophyllan. In: **Biotechnology of Biopolymers** (Steinbüchel, A.; Doi, Y. eds), v. 1, Wiley-VCH, Weinheim, p. 703-735, 2005.
- RODRIGUES, M. A. L. R. Teste CHO/HGPRT. In: **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação** (RABELLO-GAY, M. N.;
- RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. eds). **Revista Brasileira de Genética**, p. 67-74, 1991.
- SAITO, H.; YOSHIOKA, Y.; UEHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. **Carbohydrate Research**, v. 217, p. 181-190, 1991.
- SANTODONATO, J.; HOWARD, P.; BASU, D. Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. **Journal of Environmental Pathology & Toxicology**, v. 5, p. 1-364, 1981.
- SCHMID, F.; STONE, B. A.; MCDUGALL, B. M.; BACIC, A.; BROWNLEE, R. T. C.; CHAI, E.; SEVIOUR, R. J. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3; 1→6)-β-D-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 163-171, 2001.
- SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **Journal of Laboratorial and Clinical Medicine**, v. 118, p. 7-16, 1991.
- SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBS, P.A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 279-298, 1992.
- SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, pg. 447-460, 2004.
- SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Adriamycin cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 900-905, 1998.
- SINHA, B. K.; POLLITI, P. M. Anthracyclines. **Cancer Chemoterapy**, v. 11, p. 45-57, 1990.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, P. P.; WHISTLER, R. L.; TOKUZEN, R.; NAKAHARA, W. Scleroglucan: an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glaucanicum*. **Carbohydrate Research**, v. 37, p. 245-247, 1973.

SLAMENOVÁ, D; LABAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v. 198, p. 153-160, 2003.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOONTAG, V. **The Chemical Basis of Radiation Biology (TAYLOR AND FRANCIS eds)**, New York, 1987.

SPEIT, G.; HATMANN, A. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. In: **Methods in Molecular Biology (HENDERSON, D. S. eds)**, 113 DNA-repair protocols: eukaryotic systems. Human Press Inc., p. 203-212, 1999.

STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOBI, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal Basic of Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

STITELER, R. D.; PROCTOR, J. W.; YAMAMURA, Y.; MANSELL, P.W. The effect of glucan in intravenously injected tumor cells from the lung. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 24, p. 687-696, 1978.

STOCKER, H. S.; SEAGER, S. L.; CAPENER, R. L. Energy, from source to use. **Scott Foresman**, 1975.

SUGANO, N.; HIBINO, Y. Y.; MAEDA, H. Anticarcinogen actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinula edodes* mycelia. **Cancer Letters**, v. 17, p. 109-114, 1982.

SUGAWARA, I.; LEE, K. C.; WONG, M. Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and anti-tumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells. I. Characteristics of SPG-treated macrophages. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 16, p. 137-144, 1984.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SUZANECK, S. J. Doxorubicin therapy in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 182, p. 70-72, 1983.

SUZUKI, T.; TSUZUKI, A.; OHNO, N.; OHSHIMA, Y.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Synergistic action of β-glucan and platelets on Interleukin-8 production by human peripheral blood leukocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 140-144, 2002.

TAURHESIA, S.; MCNEIL, B. Physicochemical factors affecting the formation of the biological response modifier scleroglucan. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 59, p. 157-163, 1994.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of Epicatechin, Epicatechin Gallate and Quercetin on lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 278-284, 1994.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 388, p. 85-95, 1997.

TOMATIS, L. Transplacental carcinogenesis. In: **Modern Trends in Oncology. Part I. Research Progress** (RAVEN, R. W. ed.), 99 pp, 1973.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v. 358, p. 1-3, 1995.

TYRER, H. W.; CANTRELL, E. T.; HORRES, R.; LEE, I. P. PEIRANO, W. B.; DANNER, R. M. Benzo[a]pyrene metabolism in mice exposed to diesel exhaust. **Environment International**, v. 5, p. 307-311, 1981.

VANHOOREN, P. T.; VANDAMME, E. J. L-fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 479-497, 1999.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L. Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VIDELA, L. A.; VILLENA, M. I.; DONOSO, G.; DE LA FUENTE, J.; LISSI, E. R. Visible chemiluminescence induced by *t*-butyl hydroperoxide in red blood cell. **Biochemistry International**, v. 8, p. 821-830, 1984.

VIEIRA, A. J. S. C.; STEENKEN, S. Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterization of two types of isomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 6986-6994, 1990.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JHANG, J. Plant flavonoids, specially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 43, p. 2800-2802, 1995.

YAMAMOTO, T.; YAMASHITA, T.; TSUBURA, E. Inhibition of pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma by a glucan, Schizophyllan. **Invasion Metastasis**, v. 1, p. 71-84, 1981.

WANG, Y.; MCNEIL, B. Effect of temperature on scleroglucan synthesis and organic acid production by *Sclerotium glaucum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 893-399, 1995.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57-85, 1990.

WILLIAMS, D. L.; SHERWOOD, E. R.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; DI LUZIO, N. R. Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. **Hepatology**, v. 5, p. 198-206, 1985.

WILLIAMS, D. L. Overview of (1→3)-β-D-glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 247-250, 1997.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/ AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. **American Institute for Cancer Research**, Washington DC, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking water quality**, v. 3, p. 183-189, 1984.

ZEDECK, M. S. Polycyclic aromatics hydrocarbons, a review. **Journal of Environmental Pathology & Toxicology**, v. 3, p. 537-367, 1980.

ZEKOVIC, D. B.; KWIATKOWSKI, S.; VRVIC, M. M.; JAKOVLJEVIC, D.; MORA, C. A. Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 205-230, 2005.