



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA SECRETADO
POR *BOTRYOSPHERA RHODINA* MAMB-05”**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA SECRETADO
POR *BOTRYOSPHERA RHODINA* MAMB-05”**

Londrina
2015

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO
EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA SECRETADO
POR *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ilce Mara de Syllo Cólus
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Suely Gomes de Figueiredo

Londrina
2015

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L732a Lima, Maressa Cristiane Malini de.

Avaliação toxicogenética do exopolissacarídeo botriosferana secretado por
Botryosphaeria rhodina MAMB-05 / Maressa Cristiane Malini de Lima. – Londrina,
2015.

117 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Coorientador: Suely Gomes de Figueiredo

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Glucanas – Teses. 2. Polissacarídeos – Teses. 3. Mutagênese – Teses. 4. Linfócitos –
Teses. 5. Citometria de fluxo – Teses. 6. Toxicologia genética – Teses. I. Cólus, Ilce
Mara de Syllos. II. Figueiredo, Suely Gomes. III. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular. IV. Título.

CDU 575.224

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO EXOPOLISSACARÍDEO
BOTRIOSFERANA SECRETADA POR *BOTRYOSPHERA RHODINA*
MAMB-05”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ilce Mara de Syllos
Cólus
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr.^a Katia Kvitko
Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRS

Prof. Dr. Mário Antonio Spanó
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2015

Dedicatória

*Dedico esse trabalho à minha mãe, Maria Inês
e ao meu esposo Frederico Quinteiro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por ter me dado força, coragem e inspiração para realizar e finalizar este trabalho.

Ao meu esposo Frederico, por todos os esforços e sacrifícios que fez para que eu pudesse chegar até aqui. Pelo investimento, pelo amor, doação e pela paciência de ouvir as minhas angústias durante toda essa trajetória de estudo.

À minha mãe, pelo seu amor incondicional, incentivo e exemplo de coragem para que eu, assim como ela, conseguisse superar os meus limites para alcançar os meus ideais.

As irmãs carmelitas, em especial a irmã Adriana, por sua amizade, incentivo, por acalmar meu coração e por suas longas conversas e orações que me sustentaram nos momentos difíceis.

À prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllos Cólus minha eterna gratidão pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela formação científica, investimentos, amizade e confiança no meu trabalho.

À prof^a Dr^a Suely Gomes de Figueiredo pela coorientação, contribuição no projeto de tese e por fornecer toda estrutura necessária para o desenvolvimento dos ensaios na Universidade Federal do Espírito Santo.

À prof^a. Dr^a. Silvia Tamie Matsumoto por ter me dado as primeiras orientações e oportunidades de me inserir na vida acadêmica ; por sua generosidade em me ajudar a montar toda a estrutura necessária para a realização do cultivo de células na Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao bolsista PNPd, Dr. Marcelo Tempesta de Oliveira, pelo apoio nos ensaios de Biologia Molecular.

Ao Dr. Robert Dekker e à Prof^a. Dr^a. Aneli M. Barbosa, da Lakehead University Biorefining Research Institute – CANADÁ, pela produção da molécula de estudo e oportunidade de colaborar com dados sobre o botriosferana.

Ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética/ UEL, obrigada pelo convívio e ajuda durante o desenvolvimento do projeto. Em especial agradeço à Marilésia pela acolhida e amizade que sempre dedicou a mim durante todos os momentos que passei longe do meu marido, amigos e familiares.

À Prof^a. Dr^a. Roberta Losi-Guembarovski pela disposição de sempre me auxiliar durante a execução deste trabalho.

Aos amigos Gilberto, Heloísa, Fernando, Suelen e Fabiana pelo carinho e companhia em Londrina. Por nunca me deixarem sozinha durante o tempo que vivi nesta cidade.

À Natália de Paula pela amizade e acolhida em sua casa em Ribeirão Preto, durante a parte experimental que realizei na USP.

À Prof^a. Dr^a. Lusania Maria Gregg Antunes e toda a equipe do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade de ter realizado parte desta tese.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Varanda e à Dr^a. Mariana Santoro pela orientação e treinamento para a realização do teste de Ames na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Araraquara.

Ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, que gentilmente forneceu as células Jurkat para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela utilização do espectrofluorímetro em seu laboratório.

Aos voluntários que doaram o sangue e ao apoio técnico da Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo, Jefferson Codognotto, Regislaine Valéria Burim, Fabiana da Silva Lima e ao Dário Tormena.

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina.

À Banca examinadora pelo aceite e pela ajuda na melhoria deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela formação.

Agradecimento às instituições de fomento

Ao CNPq pelo auxílio financeiro à pesquisa (Processo no. 478839/2012-0)

À CAPES, pela bolsa de doutorado e auxílio PROAP concedidos.

À Fundação Araucária pelo auxílio-viagem concedido.

*O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou,
mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.*

Abraham Lincoln

LIMA, Maressa Cristiane Malini de. **Avaliação toxicogenética do exopolissacarídeo botriosferana secretado por *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**. 2015. 117 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

β -glucanas fúngicas têm apresentado propriedades imunomoduladora e anticâncer. O presente estudo avaliou os potenciais mutagênico, genotóxico, protetor e antioxidante de um exopolissacarídeo obtido do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, o botriosferana. Também foram investigadas as possíveis alterações promovidas por este exopolissacarídeo na expressão gênica e cinética do ciclo celular. A mutagenicidade foi avaliada em linhagens de *Salmonella typhimurium*. Os demais ensaios foram realizados em culturas de linfócitos humanos normais e tumorais (células Jurkat). Em todas as condições avaliadas o botriosferana não foi mutagênico, genotóxico e não reduziu espécies reativas geradas por H_2O_2 . Entretanto, protegeu o DNA de linfócitos normais e tumorais contra danos causados pelo metilmetanosulfonato em condição de pós-tratamento e tratamento simultâneo. A citometria de fluxo detectou uma população de células Jurkat tetraplóides em fase G1 após tratamento com botriosferana associado à doxorrubicina. Este efeito antiproliferativo pode estar associado à modulação negativa da expressão de genes envolvidos no *checkpoint* em G1. A repressão do gene *CCR5* em linfócitos tumorais tratados com o botriosferana sozinho ou combinado com DXR indica uma possível afinidade do exopolissacarídeo com este receptor. Portanto, o botriosferana parece estar envolvido no *checkpoint* da fase G1 do ciclo e possivelmente com a inibição da expressão do gene *CCR5*.

Palavras chaves: β -glucana. Linfócitos humanos. Células Jurkat. RT-qPCR. Citometria de fluxo. Teste de Ames.

LIMA, Maressa Cristiane Malini de. **Toxicogenetics evaluation of botryosphaeran exopolysaccharide secreted by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**. 2015. 117 p Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Fungal β -glucans have shown immunomodulatory and anti-cancer properties. The present study assessed the mutagenic, genotoxic, protective and antioxidant potential of the exopolysaccharide (EPS) obtained from the fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, the botryosphaeran. Also were investigated the possible alterations promoted by this exopolysaccharide on gene expression and cell cycle kinetic. The mutagenicity was assessed using *Salmonella typhimurium* strains. All other assays were performed using normal and tumor (Jurkat cells) human lymphocytes cultures. In all conditions evaluated the botryosphaeran was not mutagenic, genotoxic and did not reduce reactive species generated by H_2O_2 . However, protected the DNA from normal and tumor lymphocytes against damage caused by methylmetanosulphonate in post-treatment and simultaneous treatment conditions. Flow cytometry detected a tetraploid population of Jurkat cells in G1 phase after treatment with botryosphaeran associated with doxorubicin. This antiproliferative effect may be related to downregulation of the expression of genes involved in the G1 checkpoint. Repression of *CCR5* gene in tumor lymphocytes treated with botryosphaeran alone or combined with DXR indicates a possible affinity of this exopolysaccharide with this receptor. Therefore, the botryosphaeran appears to be involved in checkpoint of G1 phase of the cycle and possibly with the inhibition of the expression of *CCR5* gene

Keywords: β -glucan. Human lymphocytes. Jurkat cells. RT-qPCR. flow cytometry. Ames test.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% R	Porcentagem de redução de danos
2-ANTR	2-antramino
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>BCL-XL</i>	Linfoma de células B2
<i>BIRC5</i>	Baculovirus iap de repetição
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BRM	Modificador de resposta biológica
<i>CASP3</i>	Caspase 3
<i>CCR5</i>	Receptor de quimiocina
<i>CDK2</i>	Quinase dependente de ciclina 2
<i>CDK4</i>	Quinase dependente de ciclina 4
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
<i>CLEC7A</i>	Receptor de lectina tipo C
CM-H ₂ DCFDA	Diacetato de 2,7dicloro-di-hidrofluoresceína
C-MYC	Oncogene retroviral v- myc
CT	<i>Cycle Threshold</i>
D-glcp	Unidade D-glicopiranosil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DXR	Doxorrubicina
E	Eficiência
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPS	Exopolissacarídeo
ER	Espécies Reativas
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído- 3- fosfato desidrogenase
<i>IL-2</i>	Interleucina-2
IM	Índice de Mutagenicidade
<i>ITGAM</i>	Receptor delectina-1
LMP	Baixo ponto de fusão (<i>low melting point</i>)

MCF-7	Linhagem tumoral de mama (<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>)
MEN	Meio mínimo essencial
MN	Micronúcleo
NO	Óxido de nitrogênio
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tampão fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Reaction Chain Reaction</i>)
PI	Iodeto de propídio
PÓS	Pós-tratamento
PRRS	Receptores de reconhecimento padrão
PSK	Proteoglicana Krestin
PSP	Proteoglicanas-peptídicas
RM	Razão de Mutagenicidade
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultivo (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
S9	Fração microsomal de fígado de ratos
SBF	Soro bovino fetal
SCGE	Eletroforese para célula única em gel
SIM	Tratamento simultâneo
SMF	Fermentação submersa
TA97a, TA98T, A100 e TA102	Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>
<i>TNF-α</i>	Fator de necrose tumoral alfa
X	Média
ZY	Zymosan

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Tabela 1:** Frequência de nucleoides observados em cada classe de cometa, score e média de nucleoides com danos em linfócitos humanos normais após exposição ao botriosferana (EPS) sozinho ou associado ao metilmetanosulfonato (MMS) em tratamento simultâneo (SIM) e pós tratamento (PÓS).49
- Tabela 2:** Frequência de nucleoides observados em cada classe de cometas, score e média de nucleoides com danos em linfócitos humanos leucêmicos (Jurkat) após exposição ao botriosferana (EPS) sozinho ou associado ao metilmetanosulfonato (MMS) em tratamento simultâneo e e pós tratamento (PÓS).50
- Tabela 3:** Atividade mutagênica expressa como media e desvio padrão ($X \pm DP$) do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM) para as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a expostas a cinco diferentes concentrações, de botriosferana (EPS) com (+S9) e sem ativação metabólica (-S9) 56

Artigo 2

- Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados para cada gene analisado por RT-PCR quantitativa76

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1:** Representação esquemática dos diferentes receptores de reconhecimento padrão ancorados na membrana celular (A, B, C e D) e o reconhecimento das β -glucana fúngicas (PAMPs).....24
- Figura 2:** Estrutura química do botriosferana26
- Figura 3:** Potencial de aplicação do botriosferana.....27
- Figura 4:** Ensaio de mutação reversa com *Salmonella typhimurium*.....31

Artigo 1

- Figura 1:** Produção de Espécies Reativas (ER), em unidade relativa de fluorescência, em células Jurkat submetidas a diferentes concentrações de H_2O_2 e seu respectivo controle51
- Figura 2:** Produção de Espécies Reativas (ER), em unidades relativas de fluorescência, após tratamento de linfócitos T leucêmicos humanos (Jurkat) com diferentes concentrações de botriosferana (EPS) por 3h, 9h e 24h53
- Figura 3:** Produção de Espécies Reativas (ER), em unidades relativas de fluorescência, após tratamentos de linfócitos humanos normais com diferentes concentrações de botriosferana (EPS) por 3h, 9h e 24h54

Artigo 2

- Figura 1:** Populações de células Jurkat expostas a protocolo de tratamento com EPS individualmente ou associado com DXR. Controle: PBS-24h; DXR-2h; EPS-24h; Pré: EPS-22h seguido de DXR-2h; Simultâneo: EPS + DXR-2h; Pós: DXR-2h seguido de EPS-22h.....79
- Figura 2:** Distribuição no ciclo celular das células Jurkat tratadas com EPS individualmente ou em protocolos de associação com DXR. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. 2A: População diploide de células Jurkat. 2B: População tetraplóide de células Jurkat.....80

- Figura 3:** Porcentagens de linfócitos humanos diploides em cada fase ciclo celular determinadas por citometria de fluxo após tratame ... por 24 h com PBS (Controle), Doxorrubicina e Doxorrubicina em associação com o Botriosferana em protocolos de pré-tratamento (EPS-22h seguido de DXR-2h), tratamento simultâneo (EPS + DXR-2h) e pós tratamento (DXR-2h seguido de EPS-22).....81
- Figura 4:** Frequências de diferentes populações de células Jurkat avaliadas por citometria de fluxo após tratamento por 24h com soluções previamente incubadas de EPS (30 µg/mL) associado à DXR (20 µg/mL) por 2, 4 ou 6 horas. Controle: tratamento com PBS.....84
- Figura 5:** Expressão relativa dos transcritos gênicos *CCR5*, *IL-2*, *CDK2*, *CDK4*, *C-MYC*, *CASP3*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TNF*, *CLEC7A* e *ITGAM* por RT-qPCR em células Jurkat submetidas a tratamento com PBS (controle negativo); Doxorrubicina (DXR); botriosferana (EPS) e tratamento com EPS seguido por DXR85
- Figura 6:** Expressão relativa dos transcritos gênicos *CCR5*, *IL-2*, *CDK2*, *CDK4*, *C-MYC*, *CASP3*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TNF*, *CLEC7A* e *ITGAM* por RT-qPCR em cultura de linfócitos humanos normais submetidas a tratamento com PBS (controle negativo); Doxorrubicina (DXR); botriosferana (EPS) e tratamento com EPS seguido por DXR).....86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Glucanas	21
2.2 Botriosferana: uma β -glucana de origem fúngica.....	25
2.3 Ensaio toxicogenéticos para avaliação de novas substâncias.....	28
2.3.1 Teste de Ames	30
2.3.2 Teste do Cometa	32
2.3.3 Citometria de fluxo	34
2.3.4 RT-qPCR em tempo real	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo Geral:.....	37
3.2 Objetivos Específicos:	37
ARTIGO 1	38
ARTIGO 2	67
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 8 anos o laboratório de Mutagênese e Oncogenética (UEL) tem atuado em colaboração com os pesquisadores da área de química, Barbosa, A. e Dekker, R, na investigação dos possíveis efeitos mutagênicos do exopolissacarídeo (EPS) fúngico botriosferana, uma (1→3)(1→6)-β-D-glucana secretada no meio líquido de cultivo pelo fungo *Botryosphaeria rodhina* (isolado MAMB-05). Essa colaboração já contribuiu para demonstrar a ausência de mutagenicidade e forte efeito antimutagênico deste EPS em células do sangue periférico e da medula óssea de camundongos *in vivo*; ausência de efeitos citotóxico e mutagênico do botriosferana em linfócitos humanos *in vitro* e atividade protetora contra danos causados por peróxido de hidrogênio, doxorubicina e benzo(a)pireno em células V79 e HTC *in vitro*.

Tendo em vista estes e os resultados promissores de Giese et al. (2015) obtidos quanto aos efeitos biológicos do botriosferana, houve interesse em se ampliar a análise sobre a possível genotoxicidade e antigenotoxicidade desta molécula em linfócitos T normais e tumorais. O emprego de ensaios *in vitro* com células normais e tumorais para avaliação de sua seletividade como agente terapêutico, consiste numa ferramenta de análise importante, pois moléculas com toxicidade seletiva para células tumorais apresentam uma ação mais eficaz, diminuindo a toxicidade sistêmica.

Além da genotoxicidade, também é importante para a validação deste EPS a avaliação da sua possível mutagenicidade em células procariontes. Neste caso, o teste de Ames é o mais adequado, contribuindo para a caracterização e validação dessa biomolécula, a qual é de fácil obtenção e de baixo custo.

Um outro aspecto relevante a ser investigado é a identificação do potencial antioxidante desta biomolécula, uma vez que esta poderá promover benefícios diretos nas áreas de cosmetologia, saúde e nutrição.

Os resultados poderão indicar vias de atuação deste EPS, que serão investigadas por meio de citometria de fluxo (cinética do ciclo celular) e estudo de transcritos gênicos por meio de qPCR em tempo real.

A obtenção de todas estas informações será de grande importância para ampliar o conhecimento sobre esta biomolécula e contribuir para que esta possa, num futuro próximo, ser utilizada comercialmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glucanas

As glucanas são polímeros de glicose presentes na parede celular de bactérias, fungos e alguns cereais. São classificadas conforme o tipo de ligação glicosídica [α , β] da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

No esqueleto linear central desses polissacarídeos encontram-se as unidades D-glicopiranosil (D-glcp), unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3), podendo apresentar ramificações do tipo β -(1 \rightarrow 4) ou β -(1 \rightarrow 6), que irão determinar a estrutura terciária da glucana (ZEKOVIĆ et al., 2005). Apesar da simplicidade da sua composição, grande diversidade pode ser encontrada quanto ao número e à configuração anomérica de unidade D (glcp), posição e sequência de ligações glicosídicas ao longo de uma cadeia, grau de ramificação e conformação de sua cadeia (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). De acordo com Weng et al. (2011), as glucanas extracelulares de origem fúngica são de fácil recuperação, caracterização e purificação (SEVIOUR et al., 1992).

Os dados da literatura ainda são inconclusivos em relação ao estabelecimento de uma correlação entre estrutura química e efeito biológico das β -glucanas. Giese et al. (2015) sugeriram que moléculas com estrutura terciária apresentam maior potencial biológico. Grande parte dos estudos relata que a atividade biológica de β -glucanas pode ser influenciada por diferentes fatores, dentre os quais podemos destacar as diferentes ligações e ramificações presentes na molécula, sua fonte; solubilidade; massa molecular; estrutura secundária e carga do polímero (VOLMAN et al., 2008).

O interesse em se estudar as glucanas iniciou-se nos países orientais, principalmente na China e no Japão, que utilizam há milhares de anos fungos como recurso comestível e medicinal (ZONG et al., 2012). O interesse do ocidente por esses compostos ganhou força após a publicação de Pillemer e Ecker (1941), que comprovaram a atividade imunomoduladora de uma β -glucana presente em extratos de levedura, a qual foi denominada de Zymosan (ZY). Riggi e Di Luzio (1961) conseguiram caracterizar esta primeira β -glucana descrita e, a partir de então, uma série de pesquisas estão sendo realizadas

para melhor caracterizar o efeito deste e de novos polímeros *in vivo* (MAGNANI; CASTRO-GOMEZ, 2008; MIRANDA et al., 2008; MIRANDA-NANTES et al., 2011; MIHAILOVIĆ et al., 2013; USKOKOVIĆ et al., 2013; FALCO et al., 2014) e *in vitro* (WENG et al., 2011; YE et al., 2012; YUE et al., 2012; GIESE et al., 2015).

O lentinan é uma β -glucana isolada do fungo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler por Chihara et al. (1970). Em 1985 foi aprovada, pelo Ministério da Saúde japonês, uma injeção de lentinan para ser utilizada como adjuvante no tratamento de câncer gástrico no Japão (BISEN et al., 2010). Outra terapia à base de lentinan é a formulação S1/paclitaxel/lentinan, onde o lentinan tem sido empregado combinado com quimioterápicos para tratamentos de cânceres, como gástrico avançado, colorretal, pancreático e carcinoma hepatocelular. A utilização desta formulação tem diminuído os efeitos adversos da quimioterapia (ZONG et al., 2012).

Outros adjuvantes utilizados são as proteoglicanas Krestin (PSK) e proteoglicanas-peptídicas (PSP), isoladas do fungo *Coriolus versicolor*. O PSK é usado em células normais para imunoestimulação através da prevenção do processo apoptótico de células T circulantes, diminuição da neuropatia e reversão da supressão da medula óssea induzida pela quimioterapia (SHIBATA et al., 2011). Esta proteoglicana tem papel importante na interação com alguns quimioterápicos, potencializando a citotoxicidade destes fármacos em células tumorais. Além disso, estudos correlacionam o PSK com efeitos antitumorais diretos, por diminuir a proliferação de várias linhagens celulares tumorais, bloquear o ciclo celular e ativar o processo apoptótico (SHIBATA et al., 2011). O PSP é uma proteoglicana variante da PSK, diferindo apenas no tipo de proteína subjacente. Ela também interfere na progressão do ciclo celular, auxiliando no aumento da citotoxicidade de quimioterápicos como doxorubicina, ciclofosfamida, etoposídeo e camptotecina (WAN et al., 2010).

Outros compostos de origem fúngica também são eficazes como agentes antitumorais e imunomoduladores, apesar de ainda necessitarem de validação por ensaios clínicos com seres humanos. A fração MD, por exemplo, isolada do fungo *Grifola frondosa*, tem demonstrado efeito pró apoptótico em células tumorais por meio da ativação do gene *BAK-1* (SOARES et al., 2011). Zymosan, isolada de *S. cerevisiae*, atua aumentando a produção de

mediadores imunes, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10) (GOLDMAN et al., 1994). A carboximetil PTR, isolada de *Pleurotus tuber-regium*, foi responsável por uma atividade antiproliferativa em células tumorais de mama MCF-7 por interrupção do ciclo celular e indução de apoptose (ZHANG et al., 2006).

A eficácia das β -glucanas em estudos de imunoterapia contra tumores também tem sido testada com sucesso. Se administradas via oral as glucanas possuem a vantagem de estimularem todo o sistema imunológico, o que pode tornar mais eficaz a resposta imune (CHEN; SEVIOUR, 2007). A aplicação de uma combinação de glucana associada à imunoterapia convencional com BCG ou interferon gama pode resultar em resultados mais eficientes para pacientes submetidos ao processo de quimioterapia ou para indivíduos acometidos com doenças infecciosas (BERNER et al., 2005). Estudos pré-clínicos já estão sendo realizados com animais e têm mostrado que a combinação de β -glucana com a terapia de mAb anti-tumoral promove a regressão do tumor e aumento da sobrevivência do animal (LIU et al., 2009).

A cada dia surgem novas propostas para explicar o mecanismo de ação das β -glucanas fúngicas. Inicialmente foi descrito que estes biopolímeros pertencem ao grupo de moléculas classificadas como modificadores de resposta imunológica (ZONG et al., 2012). De acordo com Corradi Da Silva et al. (2005), estas glucanas, não citotóxicas, supostamente expressam seu efeito antitumoral por estimulação do sistema imunológico do hospedeiro.

A principal hipótese é que as glucanas sejam reconhecidas na célula como uma substância antigênica, ou seja, como sendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Desta forma, alguns tipos celulares como os fagócitos, as identificam por meio dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Após este reconhecimento ocorre o estímulo de respostas celulares para que o hospedeiro elimine o patógeno. O estímulo acontece tanto no sistema imunológico inato quanto no sistema imunológico adaptativo (CHEN; SEVIOUR, 2007; CRUVINEL et al., 2010) (Figura 1).

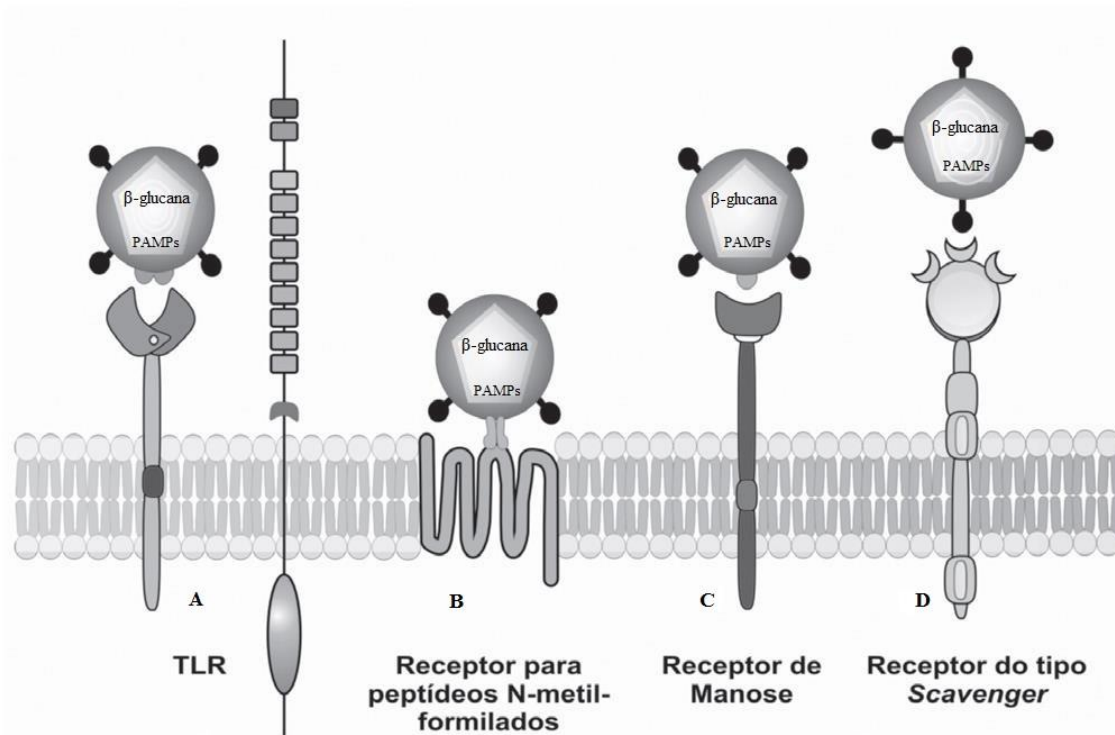


Figura 1: Representação esquemática dos diferentes receptores de reconhecimento padrão ancorados na membrana celular (A, B, C e D) e o reconhecimento das β -glucanas fúngicas (PAMPs). Adaptado de Cruvinel et al. (2010); Chen; Seviour (2007).

De acordo com estudos de Brown e Gordon (2003) é possível identificar a presença de receptores para β -glucanas em células imunes e não imunes, como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, eosinófilos, células NK, células endoteliais e fibroblastos. Os principais receptores alvos são dectina-1 (codificada pelo gene *CLEC7A*), o receptor 3 do complemento (CR3) (codificado pelo gene *ITGAM*), Lactosilseramida (CDw17) e os receptores *toll-like* (TLR-2) (Chen ;Seviour, 2007). Recentemente, foi descrito que a principal ação das β - glucanas seria por interação com receptores CR3, mediada pelo receptor dectina-1 (ZAIMAN et al., 2005).

Segundo Willment et al. (2001), a ligação com dectina-1 é capaz de ativar vias de sinalização para promover respostas imunes inata, através da ativação de fagocitose, produção de ERO e indução de citocinas inflamatórias. O receptor CR3 está associado à ativação fagocítica e citotóxica. Para Vetvicka et al. (1996), o receptor de β -glucana ligado ao CR3 e em associação com a proteína C3b inativa (iC3b) desencadeia a ativação fagocitária e citotóxica nas

células. Já o receptor *Toll like- 2* (TLR-2) está associado ao aumento dos níveis de NF- κ B e produção de citocinas (TNF alfa, IL-12), cuja mediação se faz pela proteína adaptadora MyD88 (GANTNER et al., 2003; LEBRON et al., 2003).

Este mecanismo de ligação das β -glucanas em receptores alvos associados aos estudos envolvendo a atividade biológica destas moléculas é de grande importância para a busca de agentes terapêuticos mais seletivos e servirá de ferramenta para a indústria farmacêutica para aumentar a ação do fármaco e minimizar seus efeitos colaterais.

2.2 Botriosferana: uma β -glucana de origem fúngica

O botriosferana é um exopolissacarídeo (EPS) extraído do fungo *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-5) isolado de eucalipto por Barbosa et al. (1996). Alguns anos depois, Dekker e Barbosa (2001) conseguiram isolar o EPS da secreção do *Botryosphaeria rhodina* em meio de cultivo contendo 4% (m/v) de glicose como única fonte de carbono. Em estudos com hidrólise enzimática, os mesmos autores demonstraram que a molécula isolada apresentava 98% de glicose como fonte principal de monossacarídeo, com traços de manose e glicosamida. Ainda usando estudos de hidrólise enzimática com a adição de enzimas comerciais específicas para ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6), Dekker e Barbosa (2001) mostraram que a molécula isolada se tratava de uma β -glucana.

Estudos realizados por Barbosa et al. (2003) mostraram que o botriosferana consiste de uma cadeia principal linear constituída de resíduos de glicose interligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3)- (Figura), às quais estão ligados apêndices de glicose e gentiobiose por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 6)-.

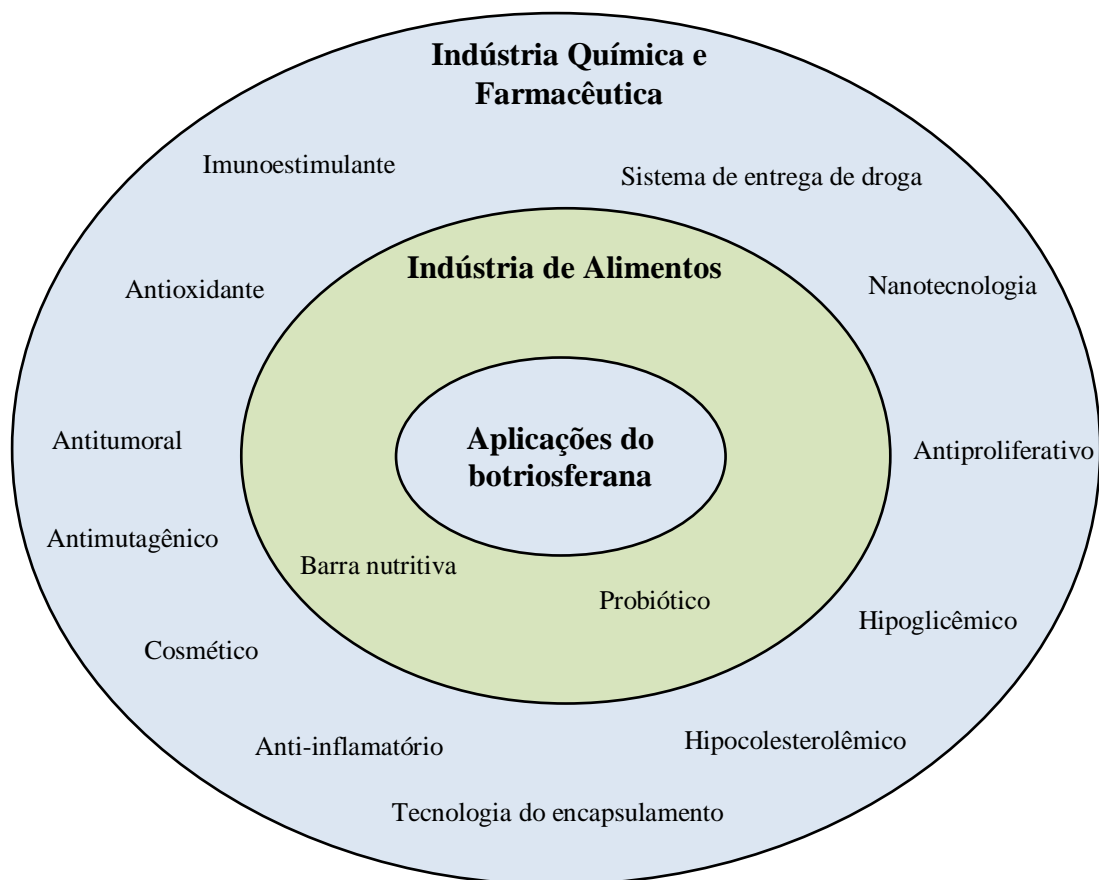


Figura 3: Potencial de aplicação do botriosferana. Adaptado de Kagimura et al. (2015).

Os estudos realizados até o momento com o Botriosferana demonstraram a ausência de mutagenicidade e forte atividade anticlastogênica em estudos *in vivo* com camundongos (MIRANDA et al., 2008). Este efeito protetor foi concentração dependente, com detecção de atividade antimutagênica significativa mesmo em baixas doses de Botriosferana (MIRANDA et al., 2008). Foram ainda observados ausência de efeitos citotóxico e mutagênico do Botriosferana em linfócitos humanos *in vitro* (MORI, 2008) e atividade protetora contra danos causados por peróxido de hidrogênio, doxorubicina e benzo(a)pireno em células V79 e HTC *in vitro* (KERCHE, 2010). Foi descrito como um potente imunomodulador em estudos com ratos e

com células RAW 264.7, onde foi capaz de ativar o processo de linfoblastogênese, aumentar a expressão de óxido nítrico sintase (*iNOS*) e de fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*) (WENG et al., 2011).

O potencial imunomodulador e as características químicas desta molécula sugerem a investigação de seu efeito antitumoral, já que (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana com conformação em hélice tripla produzem efeitos antitumorais por meio da ativação de respostas imunes no hospedeiro, estimulando a produção de citocina e atividade anti-inflamatória (BROWN e GORDAN, 2003), aumentando a imunidade contra o tumor, sem causar nenhum dano ao corpo (BORCHERS et al., 1999; WASSER; WEIS (1999).

O botriosferana também já mostrou potencial para ser utilizado como alimento funcional e diminuir os riscos de doenças crônicas, pois reduziu os níveis de colesterol e açúcar no sangue de ratos em condições induzidas de diabetes e hiperlipidemia (MIRANDA-NANTES et al., 2011). Quando derivatizada por sulfonilação, o Botriosferana exibiu atividades anticoagulante e antitrombótica (MENDES et al., 2009; BRANDI et al., 2011).

Os efeitos antioxidantes descritos por Giese et al. (2015) mostraram atividade antioxidante do botriosferana em um estudo de eliminação de espécies reativas em modelos *in vitro*. Seus resultados mostraram a elevada atividade antioxidante total (80%) e eliminação de radicais hidroxilas (90,6%) e óxido nítrico (90%). Esta forte atividade antioxidante abre novos caminhos para a utilização do Botriosferana como matéria prima para a produção de compostos anti-envelhecimento na indústria cosmética.

Diante dos efeitos biológicos descritos, estudos voltados para investigação do perigo genotóxico desta molécula são essenciais para investigar e favorecer seu processo de validação para utilização na saúde, indústria química e alimentícia.

2.3 Ensaios toxicogenéticos para avaliação de novas substâncias

A molécula de DNA está constantemente sujeita à formação de lesões, sejam elas espontâneas, como as causadas naturalmente durante os processos de replicação e reparo de DNA, ou induzidas por exposição a

agentes genotóxicos. Se essas lesões forem fixadas, tem-se uma mutação estabelecida, ou seja um evento mutagênico (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

A orientação internacional para a avaliação de segurança de um composto em relação à sua genotoxicidade baseia-se geralmente na combinação de três testes para avaliar os efeitos genotóxicos: mutação gênica, ou seja, mutações pontuais ou deleções/inserções que afetam um ou mais blocos de genes; mutagenicidade (alterações cromossômicas estruturais) e aneuploidia (alterações cromossômicas numéricas) (OECD, 1997; EASTMOND et al., 2009; OECD, 2014). No entanto, há uma tendência em se ampliar a avaliação genotóxica utilizando-se diferentes sistemas-testes, como por exemplo, o teste do cometa, a fim de detectar lesões precoces no DNA (DI SOTTO et al., 2014).

Atualmente a tecnologia das “omicas” tem sido aplicada com sucesso na triagem e priorizada em programas para descoberta de novos compostos, em especial na indústria farmacêutica (WILSON et al., 2013). A toxicogenômica é uma área emergente que visa estudar a interação entre o genoma da célula, substâncias tóxicas e doenças (BISHOP et al., 2001). Muitos pesquisadores entendem que o conhecimento da genômica pode contribuir para o desenvolvimento de alternativas não-animais para pesquisa de toxicidade, bem como ajudar a melhorar as avaliações de risco (BISHOP et al., 2001; SIMMONS; PORTIER, 2002; KREWSKI et al., 2010).

Quando um composto não apresenta efeitos citotóxicos ou mutagênicos, pode haver interesse em se avaliar seu potencial protetor. Neste caso a atividade protetora é avaliada utilizando-se diferentes protocolos de exposição das células ao composto-teste em associação com um agente promotor de danos, ou seja, um agente reconhecidamente mutagênico ou genotóxico. Portanto, a antimutagênese é empregada para designar os agentes que são capazes de reduzir a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo envolvido (WATERS et al., 1990). Kada et al. (1982) classificaram os eventos antimutagênicos conforme seu mecanismo de ação em agentes desmutagênicos e bioantimutagênicos. Os agentes desmutagênicos atuam inativando química ou enzimaticamente os agentes mutagênicos antes destes interagirem com o material genético, ou modulando o sistema de defesa antioxidante. Os agentes bioantimutagênicos

atuam sobre os mecanismos de reparo do DNA, resultando na diminuição da fixação das mutações.

A metodologias clássicas ou as baseadas nas “ômicas” são utilizadas tanto para estudos de mutagênese como de antimutagênese de um composto e utilizam desde bactérias até células humanas.

2.3.1 Teste de Ames

Testes de mutagenicidade bacteriana são utilizados mundialmente na indústria farmacêutica durante a descoberta de drogas como parte de uma estratégia de seleção de compostos. O teste de Ames tem se mostrado cerca de 65% concordante com ensaios envolvendo roedores (KIRKLAND et al., 2005) e esta característica torna-o um teste padrão ouro no ensaio de mutação *in vitro* para avaliar o potencial mutagênico de um composto químico (SNYDER, 2009). É um dos testes exigidos para submissão de dados às agências regulatórias para o registro ou aceite de muitos produtos químicos, incluindo fármacos e ingredientes alimentares. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão que regulamenta estes registros no Brasil, classifica o teste de Ames como apropriado para a identificação e avaliação do risco à saúde humana (ANVISA, 2013).

O teste de Ames (Figura 4) caracteriza-se pela utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição de pares de base no DNA (ESCOBAR et al., 2013). Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem seu caráter de auxotrofia (incapacidade de um organismo de sintetizar um composto orgânico necessário ao seu próprio crescimento) para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido deste aminoácido. Desta forma, por meio da contagem de colônias por placa é possível estabelecer a ação mutagênica de um composto em função de sua concentração (ZEIGER; MORTELMANS, 2001).

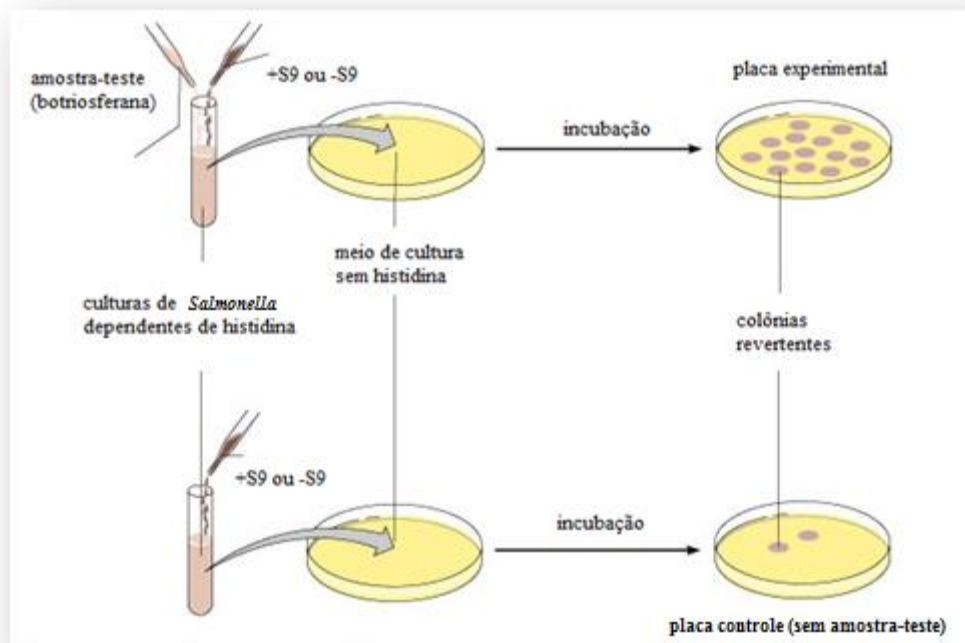


Figura 4: Ensaio de mutação reversa com *Salmonella typhimurium*. Fonte: Pearson Education, inc., publishing as Benjamin Cummings, 2006.

Existe uma variedade de cepas de *S. typhimurium* que podem ser empregadas neste ensaio. Cada uma delas apresenta diferentes mutações no operon de histidina, tornando-as incapazes de sintetizar histidina e, outras características particulares, que as tornam hábeis para a identificação de diferentes classes de agentes químicos mutagênicos (MARON; AMES, 1983).

As diretrizes estabelecidas pela OCDE recomendam as linhagens TA97a, TA98 e TA100 de bactérias para serem usadas rotineiramente na realização do teste de Ames padrão e a introdução da linhagem TA102 nos estudos envolvendo possíveis agentes mutagênicos oxidantes (WILCOX et al., 1990). Cada linhagem apresenta as seguintes características:

- TA97a: é capaz de detectar mutágenos que causam erro no quadro de leitura do DNA (*frameshift*) devido à presença de uma mutação no operon do gene da his01242. Esta mutação resulta na adição de mais uma citosina, formando uma sequência de seis citosinas, que altera o quadro de leitura e,

consequentemente, leva à reversão ao tipo selvagem (prototrófico) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

- TA98: detecta mutágenos que causam mudanças no quadro de leitura do DNA (*frameshift*), apresentando como ponto preferencial de lesão oito resíduos repetitivos GC no operon do gene *hisD3052* que codifica para a enzima histidinol desidrogenase (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

- TA100: específica para mutágenos que causam substituição de pares de bases no DNA, através de uma mutação no gene *hisG46*, que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Tem como ponto preferencial a reversão do par GC, que é responsável pela substituição de uma prolina por uma leucina (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

- TA102: apresenta pares de bases AT no sítio mutante da *hisG428*. Esta mutação foi introduzida no plasmídeo multicópia pAQ1, com o objetivo de amplificar o número de sítios ativos. A *hisG428* é uma mutação *ochre* (TAA) no gene *hisG*, que pode ser revertida por todas as seis possíveis modificações de pares de bases levando a transições e transversões. É eficiente para detectar eficientemente mutágenos que causam danos oxidativos e agentes *cross-link* (MARON; AMES, 1983).

As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que as impede de identificar agentes mutagênicos de ação indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios, a chamada fração S9, que contém enzimas metabolizadoras de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A utilização da fração S9 revela se os compostos presentes na amostra necessitam ser metabolizados para se tomarem mutagênicos (mutágenos indiretos) ou se eles têm ação direta sobre o material genético em sua forma original (mutágenos direto) (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

2.3.2 Teste do Cometa

O teste do cometa, também conhecido como SCGE (*“single cell gel electrophoresis”*), identifica agentes com atividade genotóxica, medindo quebras de fitas simples, dupla, ligações cruzadas, sítios de reparo por excisão

e/ou lesões álcali-lábeis no DNA de células individuais (FIKROVÁ et al., 2011). Pode ser utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* e em células provenientes de diferentes órgãos (VILLANI et al., 2010). Apresenta a vantagem de ser um teste simples, rápido, de baixo custo, além de necessitar de pequena quantidade de material biológico (TICE et al., 2000).

O teste do cometa foi descrito por Ostling e Johanson (1984) para a detecção de danos no DNA em condições neutras e modificado para uma versão alcalina (pH>13) por Singh et al. (1988), o que aumentou sua sensibilidade de detecção de danos na molécula de DNA. O seu princípio fundamenta-se na fixação das células em agarose, seguido de uma lise celular com detergentes com alta concentração de cloreto de sódio, rompendo as membranas celulares e gerando um nucleóide contendo DNA livre de histonas (OSTLING; JOHANSON, 1984). Estes nucleóides, ao serem submetidos a condições eletroforéticas, mostram padrões de migração relativos aos danos encontrados na molécula de DNA. Quando observadas em microscópio, apresentam aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda com os fragmentos de DNA que migram em direção ao polo positivo (HARTMANN et al., 2003). Células com maior migração apresentam maiores frequências de ruptura no DNA, enquanto que células com menores quantidades de danos têm menor migração.

O ensaio do cometa é adequado para uso na prática clínica, em áreas-chave da nutrição humana e biomonitorização (DUSINSKA; COLLINS, 2008; WASSON et al., 2008; SIROTA et al., 2014).

De acordo com OECD (2014) a associação do teste do cometa com o teste do micronúcleo é de grande importância na bateria de testes para se avaliar o potencial genotóxico, já que ambos os ensaios são altamente sensíveis, simples. Devido à versatilidade do teste do cometa, este foi recentemente incluído na Conferência Internacional sobre Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para uso Humano (ICH) S2R1 (FROTSCHL, 2015).

2.3.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que foi desenvolvida para fazer medições rápidas de partículas individuais ou células em suspensão (JUAN-GARCÍA et al., 2013), medindo a luz que elas dispersam e a fluorescência que emitem quando o fluxo celular passa por um feixe de laser (YANPAISAN et al., 1999). Informações adicionais podem ser obtidas a partir de células coradas utilizando-se fluorocromos. Quando o feixe de laser excita um fluorocromo, a luz emitida é detectada pelos detectores de fluorescência (COMAS-RIU; RIUS, 2009).

A vantagem de se usar citometria de fluxo para investigação de células tratadas com agentes químicos é a possibilidade da realização de uma análise com multiparâmetros, permitindo uma detecção simultânea de várias características funcionais de uma única célula, como por exemplo, fisiologia, ploidia, viabilidade, identidade genética, entre outras (O'HARA et al., 2011; BREHM-STECHER, 2014). Este fato tem tornado esta metodologia muito útil para a validação de novas drogas para fins comerciais, pois neste caso o uso de parâmetros únicos tem sido bastante questionado (NOLAN, 2007).

O material de boa qualidade é uma etapa importante para o sucesso da aplicação deste método. O kit *Cycle Test Plus DNA* (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) apresenta todos os reagentes necessários para preparar os núcleos para a análise do DNA. Após uma série de incubações, os núcleos isolados a partir de amostras de tecido ou qualquer suspensão de células são corados com iodeto de propídio (PI), que se intercala na dupla fita do DNA. Desta forma, os núcleos corados são analisados para quantificar o iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA, por meio da emissão de luz fluorescente entre 580 a 650 nm, que pode ser captada pelo citômetro de fluxo.

A análise da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo é indicada como uma investigação inicial, antes de serem usados métodos clínicos para investigação de novas drogas. Por este método é possível se obter informações sobre o número relativo de formação de picos abaixo da fase G₁, denominada de fase sub-G₀ e de células nas diferentes fases do ciclo celular: G₁/G₀, S e G₂/M. Além disso, fornece informações sobre eventuais células em morte.

2.3.4 RT-qPCR em tempo real

Real-time PCR é uma técnica estabelecida para a quantificação de mRNA em amostras biológicas (HUGGETT et al., 2005). Tem aplicação em diferentes áreas de investigação, como saúde, ciências veterinárias e agrárias, biotecnologia e toxicologia. Pode ser utilizada para inúmeros fins, como quantificação de agentes patogênicos; estudos de expressão do gene; análise de microRNAs; validação de dados de *microarray*; discriminação alélica e genotipagem; validação da eficácia terapêutica de drogas; estudos forenses, entre outros (NAVARRO et al., 2015).

A expressão “real time” se refere ao princípio da técnica - monitoramento constante do acúmulo do produto da PCR para estimar a quantidade inicial de mRNA (SKRZYPSKI, 2008). Este processo apresenta vários benefícios em relação aos métodos convencionais, como alta sensibilidade e exatidão na quantificação da expressão de genes, facilidade de execução, baixo custo, menor tempo e elevado rendimento (KUBISTA et al., 2006). Além disso, a detecção da amplificação na técnica de RT-qPCR é realizada durante a reação (fase exponencial), o que fornece uma vantagem distinta da PCR tradicional, onde a detecção da amplificação é realizada na fase final ou na fase platô da reação, e ainda requer a detecção em gel, após eletroforese (NOVAIS, 2004).

Segundo Ohi et al. (2005), a estratégia de análise geralmente utilizada para avaliar os dados de RT-qPCR é a quantificação relativa. Nesse tipo de análise a expressão de um gene alvo é relacionada com a de um gene de referência, estavelmente expresso, como os genes constitutivos, simultaneamente determinados na mesma amostra. De acordo com (PFAFFL, 2001), o cálculo da expressão relativa deve levar em consideração os valores de Ct (*CycleThreshold*) e E (eficiência da reação), pois diferenças mínimas observadas nessas variáveis em uma reação podem culminar em uma diferença significativa da quantidade de produto final da reação.

Alguns estudos com β -D-glucanas já utilizaram a técnica de RT-qPCR para análise de expressão gênica de amostras de tecidos e órgãos animais, principalmente em estudos envolvendo dietas suplementada com β -D- glucana (MacroGard®) em peixes, visando mostrar o efeito modulador desta molécula sobre genes de citocinas relacionadas à inflamação (FALCO et al., 2012;

FALCO et al., 2014). Também é possível encontrar o efeito β -glucano-enriquecida (β gee) contra o desequilíbrio redox hepático induzido pela diabetes e resposta inflamatória em ratos com diabetes, evidenciando um potencial importante na gestão de diabetes desta molécula (MIHAILOVIĆ et al., 2013; USKOKOVIĆ et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho teve como objetivos caracterizar o potencial mutagênico, genotóxico, antigenotóxico e antioxidante de um exopolissacarídeo (EPS) obtido do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (botriosferana), por meio de ensaios *in vitro*, bem como investigar as possíveis alterações que este composto pudesse promover na expressão gênica e cinética do ciclo celular de linfócitos humanos normais e tumorais.

3.2 Objetivos Específicos:

- Examinar a atividade mutagênica do botriosferana por meio do ensaio de mutação gênica reversa (teste de Ames), com e sem ativação metabólica.

- Avaliar a genotoxicidade (ensaio do cometa) do botriosferana em linfócitos humanos normais e células T leucêmicas (Jurkat).

- Avaliar a antigenotoxicidade do botriosferana e sua possível seletividade sobre culturas de linfócitos normais e tumorais submetidas a tratamento com o EPS associado ao agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS) por meio do ensaio do cometa.

- Investigar o papel protetor deste EPS fúngico em linfócitos humanos normais e células Jurkat sob condições de estresse oxidativo utilizando a sonda CM-H₂DCFDA.

- Investigar a influência do tratamento com botriosferana na cinética do ciclo celular de linfócitos humanos normais e células Jurkat por citometria de fluxo e determinar se há associação com os parâmetros avaliados de expressão gênica.

- Quantificar a expressão de genes relacionados com o reconhecimento de β -glucanas (*CCR5*, *ITGAM* e *CLEC7A*), imunomodulação (*IL-2* e *TNF- α*), controle do ciclo celular (*CDK2*, *CDK4*, *C-MYC* e *BIRC5*) e apoptose (*CASP3* e *BCL-XL*), por meio da técnica de RT-qPCR, para verificar se há ou não associação da β -glucana com os efeitos biológicos avaliados no presente estudo e trabalhos descritos na literatura.

ARTIGO 1



**Efeito quimiopreventivo e ausência de genotoxicidade do
exopolissacarídeo botriosferana extraído de *Botryosphaeria rhodina*
MAMB-05**

Maressa Malin¹, Mariana Santoro de Camargo², Lívia Cristina Hernandez³,
Lusânia Maria Greggí Antunes³, Carem Gledes Vargas Rechia⁴, Eliana
Aparecida Varanda², Aneli de Melo Barbosa⁵, Robert Dekker⁶, Silvia Tamie
Matsumoto⁶, Ilce Mara de Syllos Cólus^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara – SP, Brasil.

³Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brasil

⁴Departamento de Física e Química. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brasil.

⁵Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, Brasil

⁶ Biorefining Research Institute, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1.

⁷Departamento de Ciências Biológicas. Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – ES, Brasil.

***Corresponding author**

Departamento de Biologia Geral - CCB
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Rodovia Celso Garcia Cid, PR (445), Km 380
CEP 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil

e-mail: ilcecolus@gmail.com

Phone: (+55) 43 3371.4416

Fax: (+55) 43 3371.4207

A ser submetido à revista :

Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

RESUMO

Polissacarídeos fúngicos são importantes recursos naturais nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Este estudo avaliou a mutagenicidade e as propriedades genotóxicas, antigenotóxicas e antioxidante do (1→3)(1→6)-β-D-glucana botriosferana, isolado de *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-05). A mutagenicidade de cinco concentrações do botriosferana foi avaliada em *Salmonella typhimurium* (teste de Ames). Culturas de linfócitos normais e tumorais (células Jurkat) foram utilizadas para se avaliar a genotoxicidade e antigenotoxicidade (teste do cometa) do botriosferana sozinho ou em associação com o agente mutagênico metilmetanosulfonato. Também foi avaliada a capacidade de três diferentes concentrações de botriosferana reduzirem a produção de espécies reativas geradas por peróxido de hidrogênio, utilizando a sonda CM-H₂DCFDA nas culturas de linfócitos sob diferentes tempos de tratamento. Nenhuma das concentrações avaliadas do botriosferana foi mutagênica em bactérias ou induziu genotoxicidade nos linfócitos normais e tumorais. Duas concentrações protegeram o DNA de linfócitos contra os danos causados pelo MMS em condições de tratamento simultâneo e pós-tratamento, mas o botriosferana não foi capaz de reduzir as espécies reativas geradas por H₂O₂. Além da ausência de genotoxicidade, foi observado efeito protetor seletivo para linfócitos humanos normais contra danos genotóxicos causados por metilmetanosulfonato. Estes resultados serão importantes para a validação do botriosferana como agente terapêutico.

Palavra-chaves: teste de Ames, teste do cometa, β-glucana, CM-H₂DCFDA, células células Jurkat, , linfócitos T humanos.

1. Introdução

Os polissacarídeos de origem fúngica são importantes recursos naturais na busca por novos agentes com potencial terapêutico. Entre eles, as β -(1-3)-D glucanas se destacam por exercerem atividades de quimioprevenção, imunomodulação e efeito antitumoral [1]. Apresentam uma meia vida longa em mamíferos devido à metabolização lenta, decorrente da ausência das enzimas glucanases nestes organismos [2]. A capacidade de ativarem de forma inespecífica os componentes celulares e humorais do sistema imunológico do hospedeiro é bem documentada na literatura. De acordo com alguns autores, essa ativação provoca aumento da atividade funcional dos macrófagos, células mononucleares e neutrófilos [3, 4]. Apesar de alguns estudos mostrarem a ausência de efeitos tóxicos destes compostos e de seus derivados [5-11], a comprovação do risco para a saúde e do mecanismo por meio do qual as novas moléculas do tipo β -(1-3)-D glucana exercem seus efeitos sobre as células de mamíferos é uma informação fundamental para sua validação como molécula bioativa.

O botriosferana, um EPS ((1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana) isolado do fungo endófito *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-05), é formado por uma cadeia principal linear de resíduos de glicose interligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), às quais estão ligados apêndices de glicose e gentiobiose por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 6) [12, 13]. É solúvel em água, formando géis e soluções viscosas, o que favorece sua aplicação industrial em diferentes setores como saúde, biotecnologia, alimentos, farmacêutico e cosmetologia [11, 14-16].

Estudos têm avaliado diferentes efeitos do botriosferana e demonstraram ausência de mutagenicidade e atividade antimutagênica [6], capacidade de ativar o processo de linfoblastogênese [10] e potencial hipoglicêmico e hipocolesterolêmico [7]. Quando derivatizado por sulfonilação, o botriosferana ainda exibiu atividades anticoagulante e antitrombótica [17, 18]. Além disso, a atividade antioxidante do botriosferana, descrita por Giese et al. [19], o torna um potencial agente anti-envelhecimento para utilização em formulações cosméticas.

A compreensão do mecanismo pelo qual o botriosferana exerce seu efeito quimioprotetor também é um dado importante para sua validação como agente terapêutico. Investigações sobre a capacidade desta biomolécula inibir o efeito genotóxico causado por diversos compostos são fundamentais para caracterizar o seu mecanismo de ação.

Diante dos efeitos biológicos e do potencial de aplicação deste EPS descritos na literatura até o momento, faz-se necessário e importante o emprego de ensaios *in vitro* utilizando células normais e tumorais para avaliação de sua possível seletividade como agente terapêutico. De acordo com Serpeloni et al. [21], os testes *in vitro* são importantes ferramentas quando se deseja investigar o mecanismo de ação de uma droga, enquanto que os experimentos *in vivo* são recomendados para se avaliar a exposição humana ao agente terapêutico.

Assim, o presente estudo teve como objetivos investigar (i) o efeito do tratamento com EPS, sozinho ou em combinação com o agente mutagênico MMS sobre linfócitos normais e tumorais (células Jurkat), visando avaliar seu efeito genotóxico e quimioprotetor nestes tipos celulares; (ii) a possível mutagenicidade do EPS sobre diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*; (iii) o efeito antioxidante contra a produção de ER induzida pelo H₂O₂ em linfócitos normais e tumorais.

2. Material e Métodos

2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* (isolado MAMB-05) foi cultivado por fermentação submersa (SmF) utilizando-se sacarose como única fonte de carbono, por 72 horas a 28°C, sob agitação a 180 rpm, como descrito por STELUTI *et al.* [22].

2.2 Produção de botriosferana e preparo das soluções

Após o cultivo do fungo, foram removidos os micélios e recuperado o sobrenadante por centrifugação (1250g/15 minutos), seguido de diálise por

48h. O dialisado foi precipitado da solução por adição de três volumes de isopropanol e armazenado a 4°C *overnight*. Em seguida o precipitado (EPS) foi recuperado por centrifugação, dissolvido em água destilada e dialisado com trocas frequentes de água durante 48 horas. A solução de EPS foi liofilizada e armazenada a -20 °C até o uso.

Para utilização nas linhagens celulares o EPS foi solubilizado em água estéril para produzir uma solução estoque de aproximadamente 3,0 g/L. Uma amostra desta solução foi reservada para as determinações de açúcares redutores pelo método de Somogyi [23] e de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico [24]. Por meio destas dosagens foi confirmada a concentração da solução estoque e, a partir dela foram preparadas as concentrações utilizadas nos experimentos.

2.3 Ensaio com linfócitos normais e tumorais

Os efeitos biológicos do botriosferana foram investigados em culturas de linfócitos normal e leucêmico (células Jurkat).

Os linfócitos normais foram obtidos a partir da coleta de 10mL de sangue periférico de quatro indivíduos, mas somente três deles foram utilizados porque um dos indivíduos apresentou alto índice de alteração no controle negativo. Os três indivíduos da amostra eram saudáveis, do sexo masculino, com, respectivamente, 26, 34 e 34 anos de idade, não fumantes, não etilistas, sem histórico recente de doença e exposição à radiação, agrotóxicos ou medicamentos. Todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da FCFRP-Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP nº 314). O sangue coletado foi diluído em PBS (pH=7,4) na proporção de 1:1 (10 mL de sangue: 10 mL de PBS), homogeneizado por inversão e submetido à técnica de separação por gradiente de densidade com *Ficoll Histopaque®* 1077 (Sigma– Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) para a obtenção dos linfócitos isolados.

As células JURKAT foram gentilmente cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e foram mantidas em nitrogênio líquido (-196°C) até o uso.

2.3.1 Condições de cultivo e tratamentos

Para todos os experimentos descritos neste estudo os linfócitos normais foram isolados imediatamente após ser coletado o sangue periférico dos três voluntários. As células Jurkat foram descongeladas e utilizadas entre a 3ª e 9ª passagem. Para os ensaios citogenéticos, ambas as células foram cultivadas em tubos cônicos estéreis de 15 mL (Corning, Lowell, MA, USA) e para os ensaios bioquímicos as células foram cultivadas em placas de 96 poços (Corning, Lowell, MA, USA). Em todos os experimentos as células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma– Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 0,01 mg / mL de estreptomicina (CAS: 57-92-1, St Louis, MO, EUA), 0,005 mg / mL de penicilina (CAS # 61-33-6, St Louis, MO, EUA) e 2,38 mg / mL de HEPES (CAS: 75277-39-3, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os tubos e as placas foram mantidos em estufa a 37° C, com atmosfera de 5% de CO₂ numa inclinação de cerca de 45°, sendo vertidas levemente três vezes ao dia.

Para avaliar as atividades genotóxica e antigenotóxica do botriosferana sobre os linfócitos humanos normais e tumorais, foram utilizadas três concentrações não citotóxicas de EPS (7,5, 30 e 100 µg/mL) determinadas por teste do MTT realizado por nosso grupo de pesquisa nas linhagens celulares de HTC e V79 (dados não publicados). Aproximadamente 1x10⁵ células foram expostas ao EPS sozinho ou em associação com o agente mutagênico MMS (10 µM), cuja concentração foi determinada em ensaios prévios (MTT) em linfócitos humanos. . O tratamento com EPS foi realizado por 20h, iniciando-se após 28h de cultivo das células; a fixação das células ocorreu após 48h de cultivo.

No protocolo de pós tratamento os linfócitos foram cultivados por 24 horas, submetidos a tratamentos com MMS (10 µM) por 4 horas e em seguida as células foram lavadas com PBS, substituído o meio de cultura e adicionado o EPS que permaneceu por 20h em cultura, totalizando um tempo de 48h, quando as células foram fixadas. O tratamento simultâneo por 4 horas com EPS e MMS ocorreu após 44 horas do início da cultura e após o término (48h) as células foram fixadas.

Ao final dos tratamentos uma pequena alíquota da suspensão celular foi utilizada para análise de viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de Tripan. Foram consideradas válidas apenas culturas que apresentaram uma viabilidade $\geq 80\%$.

O ensaio de espécies reativas foi realizado em cultura de células Jurkat e cultura de linfócitos humanos normais. Foram avaliadas cinco concentrações de EPS (7,5; 15; 30; 60 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As concentrações de 15 e 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram incluídas neste ensaio por serem intermediárias àquelas avaliadas no ensaio do cometa. Aproximadamente, 1×10^4 células foram incubadas com EPS por 3, 9 e 24 horas e após o término de cada tempo de tratamento foi adicionado H_2O_2 (100 μM) em todos os poços. O H_2O_2 permaneceu nas culturas por 1 hora. O grupo controle positivo consistiu de células tratadas com H_2O_2 (100 μM) e o controle negativo com PBS (pH=7,4). Posteriormente as placas foram centrifugadas (300xg por 5 minutos), o sobrenadante descartado e incubados 100 μL de solução de CM- H_2DCFDA (5 μM) em todos os poços por 30 minutos.

2.4 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o *guideline* publicado por Tice *et al.* [25], com modificações. Após a eletroforese e fixação das lâminas estas foram coradas com 50 μL de solução de GelRed® (Biotium, Hayward, CA, USA) (15 μL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon-Brasil), com filtros de 488 nm de excitação e 515 nm de emissão (barreira) e objetiva de 40x. Foram analisadas 100 nucleóides por tratamento e os danos no DNA foram quantificados por avaliação visual, sendo classificado em quatro classes (0, 1, 2 e 3) de acordo com o tamanho da sua cauda [26]. Em seguida foram calculados o escore [27], a frequência de células danificadas (DC) e a porcentagem de redução de danos (%R) [28], de acordo com as fórmulas abaixo, onde N corresponde ao número de células analisadas em cada classe e CP e CN correspondem, respectivamente, aos grupos controle positivo e controle negativo.

$$\text{Escore} = \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3)}{100}$$

$$\text{DC} = \left(\frac{(N_1 + N_2 + N_3)}{100} \right) \times 100$$

$$\% R = \frac{[\text{média do escore CP}] - [\text{média do escore Tratamento}]}{[\text{média do escore CP} - \text{média do escore CN}]} \times 100$$

2.5 Detecção da geração de espécies reativas pelo ensaio de CM-H₂DCFDA

As espécies reativas intracelulares (ER) foram avaliadas usando como marcador a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (CAS# 4091-99-0, Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) de acordo com a metodologia do fabricante. CM-H₂DCFDA se difunde passivamente nas células, onde é facilmente oxidada por ER e convertida em compostos altamente fluorescentes [29]. Assim, a intensidade de fluorescência é proporcional à produção intracelular de ER.

Para a indução de espécies reativas foi utilizado o peróxido H₂O₂ e sua concentração foi previamente definida por meio de um ensaio piloto com células Jurkat expostas a concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (25 a 200 μM).

A análise de fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro (Biotek), em comprimento de onda de excitação em 485 nm e emissão em 528 nm. Todos os tratamentos foram feitos em quadruplicatas. Os resultados foram expressos em relação aos valores obtidos a partir de células tratadas somente com H₂O₂.

2.6 Teste de Ames

A mutagenicidade do botriosferana foi avaliada pelo ensaio de Ames (Salmonella/ microssoma), utilizando a metodologia de pré incubação, de acordo com Maron e Ames (1983), realizada em presença (+S9) ou ausência (-

S9) da fração microsomal S9 (Molecular Toxicology, Boone, NC, EUA), que consiste em um homogeneizado de enzimas de fígado de rato [30]. Neste estudo foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA ao laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Araraquara.

As linhagens de *S. typhimurium* foram obtidas a partir de inóculos provenientes de culturas congeladas, cultivadas por 14 h a 37 °C em caldo nutriente Oxoid nº. 2 (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL. A mistura de ativação metabólica (S9) foi adquirida na forma liofilizada (Molecular Toxicology, Boone, NC, EUA) e preparada antes de cada ensaio (4% fração S9; 1% de $MgCl_2$ 0,4 M; 1% de KCl 1,65 M; 0,5% de dissódico D-glicose-6-fosfato 1 M; 4% de NADP 0,1 M; 50% de tampão fosfato de sódio 0,2 M e 39,5 % de água destilada estéril).

O EPS nas concentrações de 75, 150, 300, 450, 600 µg/placa foi adicionado a 0,5 mL de tampão fosfato (0,2 M; pH 7,4) e 0,1mL de cultura de bactéria e incubado de 20 a 30 minutos a 37 °C. Estas concentrações foram escolhidas baseado em ensaio de citotoxicidade com *S. typhimurium*. Nos ensaios com ativação metabólica foi adicionado, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 mL da mistura S9.

Após o tempo de incubação, 2 mL de ágar de superfície (top ágar), contendo traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados à mistura que foi vertida sobre uma placa contendo ágar mínimo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 h e as colônias de revertentes His⁺ foram contadas manualmente. Os compostos utilizados como controles positivos nos ensaios sem ativação metabólica foram 4-nitro-ofenilenodiamino (CAS # 99-56-9, Sigma– Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (NPD)(10 µg/placa) para linhagens TA97a e TA98, azida sódica (CAS # 26628-22-8, Sigma– Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (2,5 µg/placa) para a linhagem TA100 e mitomicina C (CAS # 50-07-7, Sigma– Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (0,5 µg/placa) para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foram empregados os compostos 2-antramino (CAS # 613-13-8, Sigma– Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (2-ANTR) (1,25 µg/placa) para as linhagens TA97a, TA98 e TA100 e 2-

aminofluoreno (10 µg/placa) para a linhagem TA102. Os controles negativos foram realizados com o solvente das amostras, ou seja, água destilada estéril.

A partir dos resultados obtidos foi calculado o índice de mutagenicidade (IM) para cada amostra analisada, de acordo com a fórmula abaixo [30]:

$$IM = \frac{\text{Número de revertentes da placa com o composto teste}}{\text{Número de revertentes da placa com o controle negativo}}$$

2.7 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Todas as médias dos testes com células Jurkat foram obtidas a partir de três experimentos independentes. As médias originadas de testes com linfócitos normais foram obtidas de quatro indivíduos diferentes. Para os dados de genotoxicidade, antigenotoxicidade e espécie reativa foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Essas análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Instat, versão 3.02. Para os dados de mutagenicidade foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de regressão linear com nível de significância de 5%, e o software estatístico Salanal (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, Sistemas de Monitoramento Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Instituto Research Triangle, RTP, NC, EUA), adotando o modelo de Bernstein *et al.* [31].

3. Resultados

3.1 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

Os resultados obtidos do tratamento dos linfócitos normais e tumorais com o botriosferana, MMS e associação destes estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2. O agente mutagênico MMS (10 µM) foi eficiente na promoção de danos à molécula de DNA, enquanto que o EPS não mostrou qualquer evidência de efeito genotóxico em nenhuma das três concentrações testadas nos diferentes tipos celulares, sob as condições avaliadas neste experimento.

Foi observada um efeito protetor do EPS sobre os linfócitos normais e tumorais (Tabela 1 e 2). Nas células normais, este efeito protetor foi observado apenas condições de pós-tratamento com EPS em relação ao MMS, onde foi possível verificar que as duas maiores concentrações avaliadas (30 e 100 µg/mL) promoveram, respectivamente, um efeito protetor de 72,41% e 91,09%. Nas células tumorais este efeito protetor foi observado nos dois protocolos de associação, ou seja no tratamento simultâneo, em que nas concentrações de 30 e 100 µg/mL foram observadas porcentagens de redução de danos no DNA de, respectivamente, 60,71% e 63,39%, e na condição de pós-tratamento, onde as concentrações de 30 e 100 µg/mL reduziram os danos em 64,52% e 61,29%, respectivamente (tabela 2).

Tabela 1: Frequência de nucleoides observados em cada classe de cometa, escore e média de nucleoides com danos em linfócitos humanos normais após exposição ao botriosferana (EPS) sozinho ou associado ao metilmetanosulfonato (MMS) em tratamento simultâneo (SIM) e pós tratamento (PÓS).

TRATAMENTOS (µg/mL)	CLASSE DE COMETAS (100 células/ experimento)				ESCORE (X ± SD)	DANO DNA (X ± SD)	% R	
	0	1	2	3				
PBS	85,00 ± 7,00	6,67 ± 2,89	6,67 ± 2,08	2,33 ± 3,21	21,0 ± 16,64 #	0,13 ± 0,08 #	-	
EPS	7,5	79,33 ± 8,50	12,67 ± 5,51	5,00 ± 0,00	1,67 ± 1,53	27,67 ± 10,07	0,19 ± 0,07	-
	30	73,33 ± 15,28	12,00 ± 10,54	7,67,3 ± 5,51	2,00 ± 1,73	33,33 ± 22,30	0,22 ± 0,16	-
	100	79,00 ± 13,89	13,00 ± 13,86	4,33 ± 0,58	3,00 ± 1,73	30,67 ± 13,20	0,20 ± 0,14	-
MMS1	10 µM	2,33 ± 1,53	10,33 ± 7,57	23,00 ± 8,89	65,00 ± 2,65	251,33 ± 5,51 *	0,98 ± 0,01 *	-
SIM	MMS + 7,5	7,00 ± 4,58	22,00 ± 5,20	20,00 ± 1,73	54,67 ± 8,7	226,00 ± 24,06 *	0,97 ± 0,05 *	-
	MMS + 30	3,33 ± 4,93	24,33 ± 4,16	30,67 ± 4,04	42,00 ± 6,56	211,67 ± 14,57 *	0,97 ± 0,05 *	-
	MMS + 100	14,00 ± 12,77	21,67 ± 4,51	22,00 ± 4,36	41,00 ± 12,53	188,67 ± 44,12 *	0,85 ± 0,16 *	-
MMS2	10 µM	36,67 ± 13,01	15,0 ± 11,53	11,00 ± 8,66	33,33 ± 8,50	137,00 ± 27,40 *	0,59 ± 0,14 *	-
POS	MMS + 7,5	38,33 ± 5,51	28,67 ± 2,52	11,33 ± 1,53	21,67 ± 4,51	116,33 ± 15,63 *	0,62 ± 0,06 *	-
	MMS + 30	70,67 ± 16,26	13,33 ± 10,41	8,33 ± 3,21	7,67 ± 3,21	53,00 ± 25,06 #	0,29 ± 0,16 #	72,41 #
	MMS + 100	85,67 ± 2,08	4,00 ± 3,00	3,67 ± 1,53	6,67 ± 1,15	31,33 ± 4,04 #	0,14 ± 0,02 #	91,09 #

X ± SD: média ± desvio padrão; PBS: tampão fosfato – controle negativo; MMS1: metilmetanosulfonato - controle positivo para protocolo SIM (indutor de danos nas 4h finais do ciclo celular). SIM: tratamento simultâneo com EPS e MMS1; MMS2: metilmetanosulfonato - controle positivo para protocolo PÓS (indutor de danos nas 4h iniciais do ciclo celular); PÓS: tratamento das células com EPS após MMS2.*Valores estatisticamente diferentes do controle negativo (PBS) ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey. # Valores estatisticamente diferentes do controle positivo (MMS1 ou MMS2) ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

Tabela 2: Frequência de nucleoides observados em cada classe de cometas, escore e média de nucleoides com danos em linfócitos humanos leucêmicos (Jurkat) após exposição ao botriosferana (EPS) sozinho ou associado ao metilmetanosulfonato (MMS) em tratamento simultâneo e e pós tratamento (PÓS).

TRATAMENTOS (µg/mL)		CLASSE DE COMETAS (100 células/ experimento)				ESCORE (X ± SD)	DANO DNA (X ± SD)	% R
		0	1	2	3			
PBS		96,00 ± 3,61	4,00 ± 3,61	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,00 ± 3,61 [#]	0,04 ± 0,04 [#]	-
EPS	7,5	97,00 ± 2,00	2,33 ± 1,53	0,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00	3,67 ± 2,52	0,03 ± 0,02	-
	30	95,67 ± 2,08	3,00 ± 1,00	1,33 ± 1,15	0,00 ± 0,00	5,67 ± 3,21	0,04 ± 0,02	-
	100	98,33 ± 2,89	1,33 ± 2,31	0,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	2,00 ± 3,46	0,02 ± 0,03	-
MMS	10 µM	4,33 ± 2,08	55,33 ± 12,50	32,00 ± 17,78	11,33 ± 4,04	153,33 ± 15,18 [*]	0,99 ± 0,06 [*]	-
SIM	MMS + 7,5	0,00 ± 0,00	88,00 ± 5,57	11,67 ± 4,04	0,67 ± 1,15	113,33 ± 5,86 ^{* #}	1,00 ± 0,01 [*]	-
	MMS + 30	38,00 ± 3,00	55,33 ± 6,66	3,67 ± 2,89	0,00 ± 0,00	62,67 ± 6,66 ^{* #}	0,59 ± 0,06 ^{* #}	60,71 [#]
	MMS + 100	43,00 ± 4,00	56,00 ± 2,65	1,33 ± 1,15	0,00 ± 0,00	58,67 ± 4,51 ^{* #}	0,57 ± 0,04 ^{* #}	63,39 [#]
MMS	10 µM	85,67 ± 1,53	8,33 ± 1,53	1,67 ± 1,53	4,33 ± 2,31	24,67 ± 3,51 [*]	0,14 ± 0,02 [*]	-
POS	MMS + 7,5	88,33 ± 3,06	7,33 ± 3,51	2,67 ± 1,53	1,67 ± 1,53	17,67 ± 1,53 [*]	0,12 ± 0,03 [*]	-
	MMS + 30	89,67 ± 2,52	9,33 ± 3,06	1,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	11,33 ± 2,31 ^{* #}	0,10 ± 0,03	64,52 [#]
	MMS + 100	92,00 ± 2,00	7,00 ± 2,65	0,00 ± 0,00	1,67 ± 1,53	12,00 ± 2,00 ^{* #}	0,09 ± 0,01	61,29 [#]

X ± SD: média ± desvio padrão; PBS: tampão fosfato – controle negativo; MMS: metilmetanosulfonato - controle positivo para protocolo SIM (indutor de danos nas 4h finais do ciclo celular). SIM: tratamento simultâneo com EPS e MMS; MMS: metilmetanosulfonato - controle positivo para protocolo PÓS (indutor de danos nas 4h iniciais do ciclo celular); PÓS: tratamento das células com EPS após MMS.

*Valores estatisticamente diferentes do controle negativo (PBS) ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey; # Valores estatisticamente diferentes do controle positivo (MMS) correspondente ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

3.2 Espécies Reativas

Células Jurkat foram expostas a concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (25 a 200 μM) com o objetivo de avaliar a produção de ER intracelular e definir a concentração significativamente capaz de promover a liberação de ER nestas células. A Figura 1 mostra que todas as concentrações foram igualmente eficientes na geração de ER. Assim, para os experimentos com EPS foi escolhida a concentração de 100 μM , baseado em Serpeloni et al. [21].

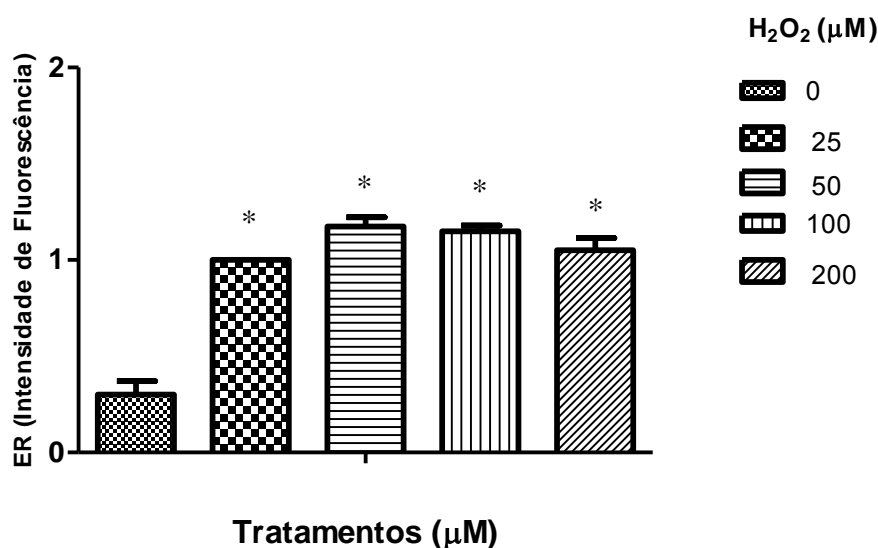


Figura 1: Produção de Espécies Reativas (ER) (em unidade relativa de fluorescência) em células Jurkat submetidas a diferentes concentrações de H_2O_2 e seu respectivo controle.

* Valores diferentes do controle negativo (0 μM) ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

Os dados referentes à exposição das culturas de linfócitos normais e tumorais ao tratamento com diferentes concentrações de EPS associadas a 100 μM de H_2O_2 , estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

A Figura 2 mostra os resultados da dosagem de espécies reativas (ER) em unidade relativa de fluorescência em células Jurkat submetidas a tratamento com o EPS a 7,5, 15, 30, 60 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 3, 9 e 24h associado

a 100 μM de H_2O_2 . As análises dos dados mostram que todas as concentrações avaliadas não diminuíram a formação de ER induzidas por H_2O_2 nos diferentes tempos de tratamento.

A dosagem de ER em unidades relativas em cultura de linfócitos humanos normais, submetidos aos mesmos tratamentos, mostraram resultados semelhantes aos apresentados por células Jurkat, uma vez que em todas as condições avaliadas houve indução significativa na produção de ER pelo H_2O_2 e ausência de proteção pelo EPS (Figura 3).

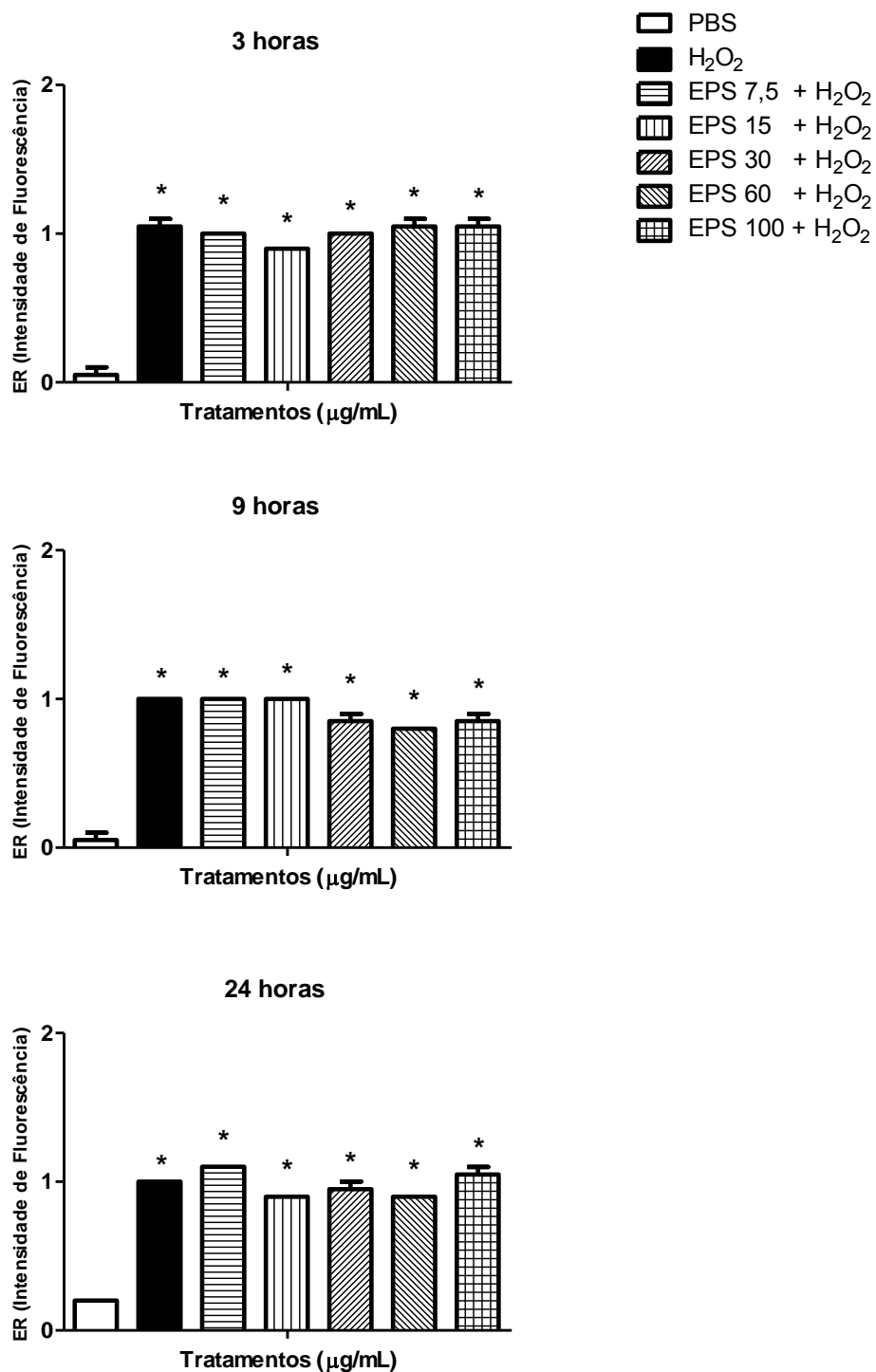


Figura 2: Produção de Espécies Reativas (ER) em unidades relativas de fluorescência após tratamento de linfócitos leucêmicos humanos (JURKAT) com diferentes concentrações de botriosferana (EPS) por 3h, 9h e 24h. * Valor diferente dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

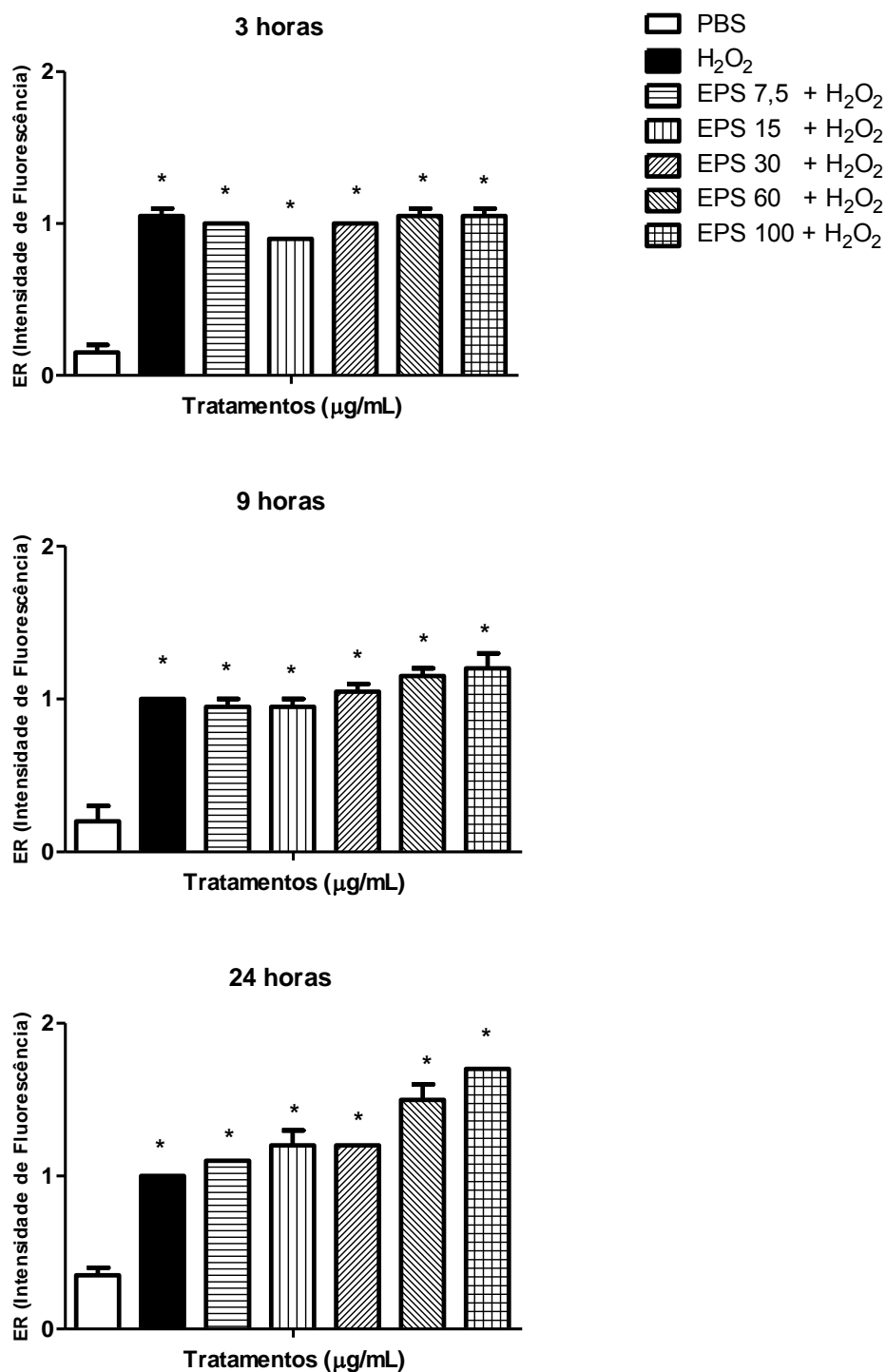


Figura 3: Produção de Espécies Reativas (ER) em unidades relativas de fluorescência após tratamentos de linfócitos humanos normais com diferentes concentrações de botriosferana (EPS) por 3h, 9h e 24h. * Valores significativos diferentes dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

3.3 Teste de Ames

A Tabela 3 mostra o número médio de revertentes por placa, o desvio padrão (DP) e o índice mutagenicidade (IM) observados após tratamento de quatro diferentes linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a, com cinco concentrações de EPS (75, 150, 300, 450, 600 µg/mL), na presença (+S9) e na ausência (-S9) de ativação metabólica. Os ensaios de mutagenicidade revelaram que o composto avaliado não induziu aumento significativo no número de colônias revertentes em nenhum dos tratamentos avaliados nas diferentes linhagens empregadas neste estudo. Também não houve diferenças nos resultados com e sem ativação metabólica.

Tabela 3: Atividade mutagênica expressa como média e desvio padrão ($X \pm DP$) do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM) para as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a expostas a cinco diferentes concentrações, do EPS com (+S9) e sem ativação metabólica (-S9).

Tratamentos $\mu\text{g/placa}$	Número de revertentes / placa ($X \pm DP$) e Índice de Mutagenicidade (IM)							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,00^a	29 \pm 2	24 \pm 2	120 \pm 6	90 \pm 4	576 \pm 13	599 \pm 2	133 \pm 21	119 \pm 11
75	33 \pm 2 (1,1)	29 \pm 2 (1,2)	126 \pm 1 (1,0)	112 \pm 27 (1,2)	577 \pm 23 (1,0)	575 \pm 16 (1,0)	125 \pm 11 (0,9)	126 \pm 8 (1,1)
150	25 \pm 1 (0,9)	25 \pm 3 (1,1)	107 \pm 3 (0,9)	90 \pm 15 (1,0)	555 \pm 27 (1,0)	604 \pm 17 (1,0)	134 \pm 4 (0,9)	136 \pm 9 (1,1)
300	25 \pm 1 (0,9)	27 \pm 6 (1,1)	130 \pm 9 (1,1)	91 \pm 4 (1,0)	554 \pm 8 (1,0)	600 \pm 11 (1,0)	133 \pm 5 (1,1)	133 \pm 8 (1,1)
450	26 \pm 2 (0,9)	31 \pm 2 (1,3)	120 \pm 3 (1,0)	97 \pm 11 (1,1)	575 \pm 6 (1,0)	627 \pm 20 (1,0)	154 \pm 21 (1,2)	123 \pm 2 (1,0)
600	28 \pm 3 (1,0)	34 \pm 4 (1,4)	114 \pm 2 (1,0)	89 \pm 11 (1,0)	541 \pm 6 (0,9)	654 \pm 11 (1,1)	139 \pm 8 (1,0)	115 \pm 11 (1,0)
C +	1455 \pm 5 ^b	292 \pm 7 ^e	2715 \pm 54 ^c	484 \pm 9 ^e	2171 \pm 59 ^d	702 \pm 6 ^f	1364 \pm 4 ^b	569 \pm 25 ^e

^aControle Negativo: água MilliQ (200 μL / placa); C+ = Controles Positivos - ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD -10,0 μg / placa); ^cazida sódica(1,25 μg / placa); ^dmitomicinaC (0,5 μg / placa) e ^e2-antramino (1,25 μg /placa); ^f2-aminofluoreno (10,0 μg / placa). * Valores diferentes dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido pelo teste de regressão linear com nível de significância de 5%.

4. Discussão

β -glucanas produzidas por algumas espécies fúngicas têm sido alvo de intensas investigações por atuarem como modificadores de resposta biológica (BRM) no hospedeiro e isto tem favorecido a sua aplicação na terapia médica [32]. A identificação e caracterização dos efeitos biológicos de moléculas desta natureza já contribuíram para introduzir no mercado farmacêutico moléculas eficazes para a terapia do câncer, como o lentinan, a D-fração, o esquizofilano, o polissacarídeo-peptídeo (PSP) e o polissacarídeo K (PSK) [33].

Apesar de grande parte da literatura associar estas moléculas a uma atividade protetora e pouco tóxica, há alguns registros envolvendo o potencial mutagênico de moléculas presentes em extratos fúngicos [34], como a agaritine de *Agaricus bisporus* [35] e as atividades carcinogênica, mutagênica e teratogênica de 11 análogos derivados de 22 espécies de cogumelos [36].

A orientação internacional da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômicos (OECD) para avaliação da mutagenicidade de um composto, indica a realização de dois testes *in vitro*: teste de mutação reversa em bactérias para avaliar mutação pontual [37] e o teste do micronúcleo em células de mamíferos para avaliar alterações cromossômicas [38]. No entanto, há uma tendência em se ampliar a avaliação genotóxica pela inclusão do teste do cometa [39], o que aumenta a sensibilidade do sistema experimental, já que este ensaio revela danos muito precoces no DNA [40, 41]. Uma vez comprovada a ausência de genotoxicidade de um composto, este pode ser avaliado quanto ao seu potencial protetor contra danos causados no DNA.

A presente investigação envolvendo estudos genotóxicos e mutagênicos *in vitro* em culturas de linfócitos humanos normais e tumorais e linhagens de *S. typhimurium*, do exopolissacarídeo botriosferana (β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana), ampliou, por meio dos testes de Ames e do cometa, a abordagem genotóxica realizada *in vivo* por Miranda *et al.* [6], o que será fundamental para a validação desta molécula.

Testes de mutagenicidade bacteriana são utilizados mundialmente na indústria farmacêutica durante a descoberta de drogas como parte de uma estratégia de seleção de compostos. O teste de Ames tem se mostrado mais

de 50% de concordância com ensaios de genotoxicidade envolvendo roedores [42].

O fato do índice de mutagenicidade das cinco concentrações de botriosferana avaliadas no teste de Ames ter sido inferior a duas vezes ao observado no grupo controle negativo, possibilita inferir que este EPS, nas condições avaliadas, não apresenta perigo mutagênico, na presença ou ausência da fração S9.

Dados negativos obtidos quanto a genotoxicidade e mutagenicidade do botriosferana neste estudo corroboram os resultados do nosso grupo de pesquisa obtidos com o teste do micronúcleo *in vivo* em camundongos [6] e outros ainda não publicados, abrangendo o teste do micronúcleo e do cometa *in vitro* com outras duas linhagens de mamíferos (V79 e HTC). A combinação do ensaio de mutação reversa e o teste do micronúcleo tem se mostrado eficiente para avaliar o potencial genotóxico de novas moléculas, de modo que, quando os resultados de ambos os testes forem negativos, novos testes genotóxicos não são necessários [43]. Diante do exposto, é possível considerar o botriosferana como uma molécula com baixa atividade mutagênica e genotóxica, o que contribuirá para o seu processo de validação como agente terapêutico.

A indução de mutações e de doenças associadas com efeitos genotóxicos em células germinativas ou somáticas é o resultado da interação entre fatores de risco e a resposta do organismo hospedeiro [44]. Por isso, é importante avaliar se moléculas como o botriosferana são capazes de modular a maquinaria de proteção celular e terem uma aplicação em estratégias preventivas.

Tendo em vista o potencial das β -glucanas de modificarem a resposta biológica do hospedeiro, foram realizados ensaios antígenotóxicos para comprovar a ação protetora do botriosferana contra danos induzidos pelo agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS) em culturas de linfócitos humanos normais e tumorais. Os resultados indicam que o tratamento com o botriosferana foi capaz de exercer ação protetora nas células normais e tumorais avaliadas, sendo mais eficiente em condição de pós-tratamento para células normais. Portanto, a redução de 72,4% e 91,09% dos danos induzidos pelo MMS em linfócitos humanos normais tratados, respectivamente, com 30 e

100 µg/mL de EPS, sob condições de tratamento simultâneo e pós tratamento direciona a ação deste composto para uma possível alteração de expressão de sinais intracelulares, relatada como bioantimutagênica por Kada *et al.* [45]. Este mecanismo de modulação de sinais intracelulares possivelmente é iniciado pela ligação do botriosferana a receptores específicos da membrana celular, tais como os receptores CR3 e dectina-1, já descritos como capazes de interagir com as β- glucanas [46]. No entanto, dados recentemente publicados por nosso grupo de pesquisa [47], envolvendo análise de expressão gênica de alguns receptores de reconhecimento de β- glucana, não indicaram interferência do botrisferana na expressão dos genes que codificam os receptores CR3 e dectina. Por outro lado, foi observada uma repressão nos transcritos do gene *CCR5* em tratamentos com EPS sozinho ou associado à DXR na célula normal, o que pode indicar um possível mecanismo molecular da ação do botriosferana. É provável que esta molécula tenha afinidade de ligação ao receptor *CCR5* e promova a sua inibição [47]. Segundo Weitzenfeld *et al.* [48], a alta expressão do gene *CCR5* é associada à pró-malignidade e ao crescimento tumoral.

A promoção de efeitos protetores frente aos danos induzidos pelo MMS em linfócitos normais e o efeito antitumoral observado sobre células Jurkat tratadas pela associação de DXR e EPS [47], ambos em condição de pós tratamento, demonstram a capacidade desta molécula de exercer diferentes formas de proteção, visto que a DXR e o MMS são agentes que exercem danos distintos nas células

A atividade antitumoral das β-glucanas também pode ser influenciada por sua capacidade antioxidante. Recentemente Gieise *et al.* [19] avaliaram, em um estudo de eliminação de radicais livres em modelo *in vitro*, na ausência de células, a atividade antioxidante do botriosferana, comparando-o com outras glucanas. Seus resultados mostraram elevada atividade antioxidante total (80%) e eliminação de radicais hidroxilas (90,6%) e óxido nítrico (90%). No presente estudo o botriosferana não apresentou efeito antioxidante em nenhuma das concentrações avaliadas em culturas de linfócitos normais e tumorais sob tratamento com H₂O₂, não corroborando dados de Gieise *et al.* [19], que observaram uma capacidade antioxidativa deste EPS em relação ao H₂O₂ (38%).

Esta ausência de atividade antioxidante em sistemas celular, encontrada neste estudo, pode ser devido a baixa concentração avaliadas de botriosferana, quando comparada com estudos de Giese et al. [19], que encontrou atividade mais revelantes na concentração de 3 g/L. Embora os ensaios químicos sejam amplamente aceitos para avaliação antioxidante, estes não são representativos das condições celulares do homem [49, 50].

5. Conclusão

Este estudo mostrou a ausência de mutagenicidade e genotoxicidade do botriosferana em, respectivamente, *S. typhimurium* e linfócitos humanos. Também foi verificada atividade antígeno-tóxica desta molécula frente aos danos induzidos em linfócitos normais e tumorais pelo agente alquilante MMS. Apesar de haver relatos na literatura sobre a capacidade antioxidante de exopolissacarídeos fúngicos, o botriosferana não reduziu a produção de ER induzida por H_2O_2 em culturas de linfócitos humanos.

Os achados deste estudo reforçam a ausência de efeitos genotóxicos deste EPS, contribuindo para a validação de seu uso em vários setores da economia. O presente estudo ainda estimula a realização de futuras investigações que conduzam a um melhor entendimento sobre os mecanismos de proteção que o botriosferana é capaz de estimular em linfócitos humanos após tratamento com agentes alquilantes.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo no. 478839/2012-0). Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de doutorado concedida a Malini, M e ao CNPq pelas bolsas PQ concedidas para Cólus, I.M.S e Antunes, L.M.G. Agradecem aos voluntários que doaram o sangue e ao apoio técnico da Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo, Jefferson Codognotto, Regislaine Valéria Burim, Fabiana da Silva Lima e ao Dário Tormena.

Referencias Bibliográficas

- [1] M.-F. Moradali, H. Mostafavi, S. Ghods, G.-A. Hedjaroude, Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi), *International Immunopharmacology*, 7 (2007) 701-724.
- [2] I. Nono, N. Ohno, A. Masuda, S. Oikawa, T. Yadomae, Nono I, Ohno N, Masuda A, Oikawa S, Yadomae T 1991. Oxidative degradation of an antitumor (1-3)-b-D-glucan, Grifolan. *J Journal of pharmacobio-dynamics*, 14 (1991) 9-19.
- [3] E. Wakshull, D. Brunke-Reese, J. Lindermuth, L. Fisetete, R.S. Nathans, J.J. Crowley, J.C. Tufts, J. Zimmerman, W. Mackin, D.S. Adams, PGG-Glucan, a soluble β -(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF- κ B-like factor in human PMN: Evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-glucan receptor, *Immunopharmacology*, 41 (1999) 89-107.
- [4] J. Liang, D. Melican, L. Cafro, G. Palace, L. Fisetete, R. Armstrong, M.L. Patchen, Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity, *International Journal of Immunopharmacology*, 20 (1998) 595-614.
- [5] P. Roupas, J. Keogh, M. Noakes, C. Margetts, P. Taylor, The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence, *Journal of Functional Foods*, 4 (2012) 687-709.
- [6] C.C.B.O. Miranda, R.F.H. Dekker, J.M. Serpeloni, E.A.I. Fonseca, I.M.S. Cólus, A.M. Barbosa, Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, *International Journal of Biological Macromolecules*, 42 (2008) 172-177.
- [7] C.C.B.O. Miranda-Nantes, E.A.I. Fonseca, C.T.B.V. Zaia, R.F.H. Dekker, N. Khaper, I.A. Castro, A.M. Barbosa, Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats, *Mycobiology*, 39 (2011) 187-193.
- [8] M. Zhang, S.W. Cui, P.C.K. Cheung, Q. Wang, Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, *Trends in Food Science & Technology*, 18 (2007) 4-19.

- [9] H. Wang, Y.M. Liu, Z.M. Qi, S.Y. Wang, S.X. Liu, X. Li, An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties., *Current Medicinal Chemistry*, 20 (2013 , 20,) 2899-2913.
- [10] B.B.-C. Weng, Y.-C. Lin, C.-W. Hu, M.-Y. Kao, S.-H. Wang, D.-Y. Lo, T.-Y. Lai, L.-S. Kan, R.Y.-Y. Chiou, Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101, *Food and Chemical Toxicology*, 49 (2011) 910-916.
- [11] F.Y. Kagimura, M.A.A. da Cunha, A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker, C.R.M. Malfatti, Biological activities of derivatized d-glucans: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72 (2015) 588-598.
- [12] A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker, G.E.S. Hardy, 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*, 23 (1996) 93-96.
- [13] A.M. Barbosa, R.M. Steluti, R.F.H. Dekker, M.S. Cardoso, M.L. Corradi da Silva, Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -d-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp, *Carbohydrate Research*, 338 (2003) 1691-1698.
- [14] R.A.M. Bongiovani, Nota Científica: Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono, *Brazilian Journal of Food Technology*, 12 (2009) 53-59.
- [15] A.F.D. Vasconcelos, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa, E.R. Carbonero, J.L.M. Silveira, B. Glauser, M.S. Pereira, M.d.L. Corradi da Silva, Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1 \rightarrow 6)-d-glucan (lasiodiplodan), *Carbohydrate Polymers*, 92 (2013) 1908-1914.
- [16] S. Pentikäinen, L. Karhunen, L. Flander, K. Katina, A. Meynier, P. Aymard, S. Vinoy, K. Poutanen, Enrichment of biscuits and juice with oat β -glucan enhances postprandial satiety, *Appetite*, 75 (2014) 150-156.
- [17] J. Brandi, E.C. Oliveira, N.K. Monteiro, A.F.D. Vasconcelos, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa, J.L.M. Silveira, P.A.S. Mourão, M.d.L. Corradi da Silva, Chemical Modification of Botryosphaeran: Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Water-Soluble Sulfonated (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucan, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (2011) 1036 - 1042.

- [18] S.F. Mendes, O.d. Santos Jr, A.M. Barbosa, A.F.D. Vasconcelos, G. Aranda-Selverio, N.K. Monteiro, R.F.H. Dekker, M.S. Pereira, A.M.F. Tovar, P.A.d.S. Mourão, M.d.L.C.d. Silva, Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45 (2009) 305-309.
- [19] E.C. Giese, J. Gascon, G. Anzelmo, A.M. Barbosa, M.A.A. da Cunha, R.F.H. Dekker, Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72 (2015) 125-130.
- [20] T. Kada, T. Inoue, M. Namiki, Environmental desmutagens and antimutagens, *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, 1 (1982) 134-152.
- [21] J.M. Serpeloni, G.R.M. Barcelos, J.P. Friedmann Angeli, A.Z. Mercadante, M. Lourdes Pires Bianchi, L.M. Greggi Antunes, Dietary carotenoid lutein protects against DNA damage and alterations of the redox status induced by cisplatin in human derived HepG2 cells, *Toxicology in Vitro*, 26 (2012) 288-294.
- [22] R.M. Steluti, E.C. Giese, M.M. Piggato, A.F.G. Sumiya, L.G. Covizzi, A.E. Job, M.S. Cardoso, M. De Lourdes Corradi Da Silva, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa, Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features, *Journal of Basic Microbiology*, 44 (2004) 480-486.
- [23] M. Somogyi, A NEW REAGENT FOR THE DETERMINATION OF SUGARS, *Journal of Biological Chemistry*, 160 (1945) 61-68.
- [24] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28 (1956) 350-356.
- [25] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (2000) 206-221.
- [26] H. Kobayashi, C. Sugiyama, Y. Morikawa, M. Hayashi, T. Sofuni, A comparison between manual microscopic analysis and computerized image

analysis in the single cell gel electrophoresis assay, *MMS Commun*, 3 (1995) 103–115.

[27] K. Manoharan, M.R. Banerjee, β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture, *Cell Biology International Reports*, 9 (1985) 783-789.

[28] M.D. Waters, A.L. Brady, H.F. Stack, H.E. Brockman, Antimutagenicity profiles for some model compounds, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238 (1990) 57-85.

[29] T. Lu, T. Finkel, Free radicals and senescence, *Experimental Cell Research*, 314 (2008) 1918-1922.

[30] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113 (1983) 173-215.

[31] L. Bernstein, J. Kaldor, J. McCann, M.C. Pike, An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 97 (1982) 267-281.

[32] M.Y.K. Leung, C. Liu, J.C.M. Koon, K.P. Fung, Polysaccharide biological response modifiers, *Immunology Letters*, 105 (2006) 101-114.

[33] A. Zong, H. Cao, F. Wang, Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research, *Carbohydrate Polymers*, 90 (2012) 1395-1410.

[34] T. Sugimura, Nutrition and dietary carcinogens, *Carcinogenesis*, 21 (2000) 387-395.

[35] B.L. Pool-Zobel, P. Schmezer, Y. Sinrachatanant, F. Kligasioglu, K. Reinhart, R. Martin, P. Klein, A.R. Tricker, Mutagenic and genotoxic activities of extracts derived from the cooked and raw edible mushroom *Agaricus bisporus*, *J Cancer Res Clin Oncol*, 116 (1990) 475-479.

[36] B. Toth, Carcinogenic fungal hydrazines, *In Vivo*, 5 (1991) 95-100.

[37] OECD, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Publishing 1997.

[38] OECD, Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing 2014.

- [39] A. Di Sotto, F. Maffei, P. Hrelia, S. Di Giacomo, E. Pagano, F. Borrelli, G. Mazzanti, Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68 (2014) 16-22.
- [40] A.R. Collins, Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840 (2014) 794-800.
- [41] A. Kimura, A. Miyata, M. Honma, A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutagenesis*, 28 (2013) 583-590.
- [42] D. Kirkland, M. Aardema, L. Henderson, L. Müller, Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 584 (2005) 1-256.
- [43] D. Kirkland, L. Reeve, D. Gatehouse, P. Vanparrys, A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721 (2011) 27-73.
- [44] S. De Flora, C. Ramel, Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 202 (1988) 285-306.
- [45] T. Kada, K. Shimoi, Desmutagens and bio-antimutagens – their modes of action, *BioEssays*, 7 (1987) 113-116.
- [46] B.-Z. Zaidman, M. Yassin, J. Mahajna, S. Wasser, Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics, *Appl Microbiol Biotechnol*, 67 (2005) 453-468.
- [47] M. Malini, M.F. de Souza, M.T. de Oliveira, L.M.G. Antunes, S.G. de Figueiredo, A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker, I.M. de Syllos Cólus, Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a ((1→3)(1→6)-β-d-glucan) in human lymphocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [48] P. Weitzenfeld, A. Ben-Baruch, The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer, *Cancer Letters*, 352 (2014) 36-53.

[49] F. Peris, Y. Saco, C. Gafo, A. Bassols, Comparison of two commercial kits for the enzymatic determination of nonesterified fatty acids in goat serum, *Small Ruminant Research*, 26 (1997) 181-187.

[50] L.R. Fukumoto, G. Mazza, Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds†, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 3597-3604.

ARTIGO 2**Modulação da expressão e ciclo celular do botriosferana, ((1→3)(1→6)-β-D-glucana), em linfócitos humanos normais e tumorais**

Maressa Malini¹, Marilesia Ferreira de Souza¹, Marcelo Tempesta de Oliveira¹, Lusânia Maria Gregg Antunes², Suely Gomes de Figueiredo³, Aneli M. Barbosa^{4,5}, Robert F.H. Dekker⁵, Ilce Mara de Syllos Cólus^{1*}

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brasil

² Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brasil

³ Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – ES, Brasil.

⁴ Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas - Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brasil

⁵ Biorefining Research Institute, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1

* Corresponding author

Departamento de Biologia Geral - CCB
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Rodovia Celso Garcia Cid, PR (445), Km 380
CEP 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil

e-mail: ilcecolus@gmail.com

Phone: (+55) 43 3371.4417

Fax: (+55) 43 3371.4207

Submetido à revista:

International Journal of Biological Macromolecules

Resumo

Existe um interesse crescente no potencial imunomodulador e anticâncer de β -glucanas fúngicas. No presente estudo foi avaliada a modulação da expressão de genes e a cinética do ciclo celular em linfócitos normal e tumoral (Jurkat) humanos após tratamento com o exopolissacarídeo fúngico (EPS) botriosferana ((1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana), de *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-05). As culturas de células foram tratadas com botriosferana sozinha ou em combinação a doxorrubicina (DXR), em protocolo de pós-tratamento. A expressão de genes relacionados com os processos de imunomodulação, apoptose e controle do ciclo celular, bem como receptores de β -glucanas foi avaliada. As análises de cinética do ciclo celular detectaram uma população de células tetraploides em fase G1 nas células Jurkat tratadas com EPS associado à DXR. Este efeito antiproliferativo na fase G1 pode estar associado à modulação negativa da expressão de genes envolvidos no *checkpoint* em G1. A repressão do gene *CCR5* em tratamento com o botriosferana, sozinho ou combinado, com DXR, em linfócitos tumorais, indica uma possível afinidade do EPS com este receptor. Portanto, a ação botriosferana parece estar envolvida na repressão de genes relacionados com a fase G1 do ciclo celular e, possivelmente, na interação do botriosferana, quer isoladamente, ou em combinação com DXR, com o receptor CCR5.

Palavra chave: β -D-glucana fúngica, Linfócitos humanos, doxorrubicina.

Abstract

There is growing interest in the anticancer and immunomodulatory potential of fungal β -D-glucans. In the present study, the modulation of gene expression via RT-qPCR and cell cycle kinetics via flow cytometry were assessed in human normal and tumour (Jurkat) lymphocytes after treatment with botryosphaeran (a fungal (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan) from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Cell cultures were treated with botryosphaeran either alone, or in combination with doxorubicin (DXR), in a post-treatment protocol. The expression of genes involved in immunomodulatory processes, apoptosis and cell cycle control, as well as β -D-glucans cell receptors were assessed. Flow cytometry analysis identified tetraploid Jurkat cells in G₁ phase when treated with botryosphaeran combined with DXR. This antiproliferative effect in G₁ may be associated with down-regulation of the expression of genes involved in the G₁ checkpoint. The repression of the *CCR5* gene following botryosphaeran treatment, either alone or in combination with DXR, in tumour lymphocytes indicates a possible affinity of this particular ((1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan) for the receptor CCR5. Therefore, botryosphaeran action appears to be involved in the repression of genes related to the G₁ phase of the cell cycle and possibly in the interaction of the botryosphaeran, either alone, or in combination with DXR, with the CCR5 receptor.

Keywords: fungal β -D-glucan, human lymphocytes, doxorubicin.

1. Introdução

Exopolissacarídeos (EPSs) são biopolímeros de carboidratos extracelular produzidos durante o processo metabólico de microrganismos como os fungos [1]. Geralmente estão associados com proteção das células contra o ambiente externo, reserva de carbono e energia durante os períodos de estresse ambiental [2].

Segundo Roupas et al. [3], numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* já descreveram os benefícios destes compostos para a saúde, incluindo efeitos imunomodulador, antitumoral, antimicrobiano e hipocolesterolêmico. A eficácia dos EPS como imunomoduladores, principalmente os do grupo das β -glucanas, permitiu a validação e aprovação no Japão de algumas moléculas desta natureza como adjuvantes para o tratamento do câncer, como por exemplo, as formulações compostas de lentinina e a proteoglicana Krestin (PSK) [4].

A atividade antitumoral das β -glucanas ocorre devido à sua capacidade de atuar como modificadores de respostas biológicas (BRMs) [5], o que envolve ligação destas moléculas a receptores específicos de células do hospedeiro, como o receptor de membrana CR3 e dectina-1 [6, 7]. Isto leva à produção de citocinas e, conseqüentemente, à estimulação do sistema imunológico por meio de seus efeitos sobre células NK, macrófagos e células T [6].

Recentemente Zong et al. [8] propuseram que a ação antitumoral das glucanas pode acontecer por prevenção do desenvolvimento de neoplasias devido ao consumo dessas moléculas ativas; por ação direta anticâncer, tais como indução de apoptose em células tumorais; por imunopotenciação da atividade antitumoral em combinação com a quimioterapia e por inibição de metástases tumorais. O registro de estudos com intervenções diretas do consumo de polissacarídeos fúngicos em seres humanos é escasso e os que existem indicam pouco ou nenhum efeito colateral [3].

O botriosferana, um EPS ((1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana) isolado do fungo endófito *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-05), é formado por uma cadeia principal linear de resíduos de glicose interligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), às quais estão ligados apêndices de glicose e gentiobiose por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 6) [9].

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa revelaram ausência de mutagenicidade e forte efeito antimutagênico deste EPS em células do sangue periférico e da medula óssea de camundongos *in vivo*. Este efeito protetor foi dose dependente, com detecção de atividade antimutagênica significativa mesmo em baixas doses de botriosferana [10]. Recentemente Miranda et al. [11] demonstraram que o botriosferana possui propriedades hiperglicêmicas e hipocolesterolêmicas em ratos sob condições de diabetes e hiperlipidemia.

Diante dos efeitos biológicos descritos até o momento para o botriosferana e do seu potencial de aplicação terapêutico e biotecnológico, o emprego de ensaios *in vitro* com células normais e tumorais para avaliação de sua seletividade como agente terapêutico, consiste numa ferramenta de análise importante. Moléculas com atividade seletiva para células tumorais diminui a toxicidade sistêmica e produz uma ação mais eficaz [12].

Estudos de expressão gênica associados à grade versatilidade dos ensaios de citometria de fluxo, que fornece alvos múltiplos e simultâneos para avaliar morte celular e cinética celular em populações de células selecionadas foram utilizados neste estudo. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do tratamento com EPS, sozinho ou em combinação com o quimioterápico DXR sobre linfócitos normais e tumorais, visando avaliar o seu efeito sobre a modulação da expressão de genes associados ao reconhecimento de β glucana, à imunomodulação, apoptose e à regulação do ciclo celular; bem como avaliar o efeito desse tratamento sobre a cinética do ciclo celular.

2. Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo e condição de cultivo

Botryosphaeria rhodina (isolada MAMB-05) foi cultivado por fermentação submersa (SmF) utilizando-se sacarose como única fonte de carbono, por 72 horas a 28°C, sob agitação a 180 rpm, como descrito por STELUTI *et al.* [13].

2.2 Produção de botriosferana

Após o cultivo do fungo, foram removidos os micélios e recuperado o sobrenadante por centrifugação (1250g/15 minutos), seguido de diálise por 48h. O dialisado foi precipitado da solução por adição de três volumes de isopropanol e armazenado a 4°C *overnight*. Em seguida o precipitado (EPS) foi recuperado por centrifugação, dissolvido em água destilada e dialisado com trocas frequentes de água durante 48 horas. A solução de EPS foi liofilizada e armazenada a -20°C até o uso.

2.3 Preparo das soluções de botriosferana

Para utilização nas linhagens celulares o EPS foi solubilizado em água estéril para produzir uma solução estoque de aproximadamente 3,0 g/L. Uma amostra desta solução foi reservada para as determinações de açúcares redutores pelo método de Somogy [14] e de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico [15]. Através destas dosagens confirmada a concentração de 3,0 g/L e esta solução estoque foi utilizada durante os experimentos.

2.4 Cultura de célula

Os efeitos biológicos do botriosferana foram investigados em culturas de linfócitos T normal e leucêmico (células Jurkat).

Os linfócitos T normais foram obtidos a partir da coleta de 10mL de sangue periférico de quatro indivíduos do sexo masculino, saudáveis, na faixa etária de 18 a 35 anos, não fumantes, não etilistas, sem histórico recente de doença e exposição à radiação, agrotóxicos ou medicamentos. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da FCFRP- Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP nº 314). O sangue coletado foi diluído em PBS na proporção 1:1 (10 mL de sangue: 10 mL de PBS), homogeneizado por inversão e submetido à técnica de separação por gradiente de densidade

com *Ficoll Histopaque®* 1077 (sigma-aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a obtenção dos linfócitos isolados.

As células JURKAT foram gentilmente cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e foram mantidas em nitrogênio líquido até o uso.

2.5 Condições de cultivo

Os linfócitos normais e tumorais foram cultivados em tubos cônicos estéreis de 15 mL (25 cm², Corning, Lowell, MA, USA) contendo meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 0,01 mg / mL de estreptomicina (CAS: 57-92-1, St Louis, MO, EUA), 0,005 mg / mL de penicilina (CAS: 61-33-6, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 2,38 mg / mL de HEPES (CAS: 75277-39-3, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os frascos foram mantidos a 37° C, com atmosfera de 5% de CO₂ numa inclinação de cerca de 45°, sendo vertidos levemente em torno de três vezes por dia.

2.6 Delineamento experimental

Para avaliar o efeito do EPS (30 µg/mL) isolado ou em combinação com o quimioterápico Doxorubicina-DXR (0,20µg/mL) sobre a cinética do ciclo celular de linfócitos normais e tumorais, aproximadamente 2x10⁵ células foram semeadas em tubos cônicos estéreis de 15 mL, incubadas por um ciclo celular (24h) em meio de cultura RPMI 1640 completo e posteriormente submetidas a um dos seguintes tratamentos: PBS por 24h (controle negativo); DXR por 2h (controle positivo); EPS por 24h (tratamento com botriosferana); EPS + DXR por 2h (tratamento simultâneo); EPS por 22h, lavagem dos tubos, troca de meio de cultura e adição de DXR por 2h (pré-tratamento); DXR por 2h, lavagem dos tubos, troca de meio de cultura e adição do EPS por 22h (pós-tratamento).

Para os ensaios de expressão gênica foi mantida a mesma concentração do EPS (30 µg/mL), porém, apenas o protocolo de pós-tratamento foi avaliado.

Todos os ensaios envolvendo células Jurkat foram realizados por meio de três experimentos independentes e, cada um contendo triplicata experimental.

2.7 Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo

As amostras para análise em citômetro de fluxo foram preparadas utilizando-se o kit *Cycle Test Plus DNA* (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Após cada tratamento os tubos foram centrifugados a 300 x g por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de *Buffer solution* em vórtex sob baixa velocidade, conforme descrição do kit. O material foi novamente centrifugado nas mesmas condições e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de PBS seguido de uma nova centrifugação. Após esta etapa, todo o sobrenadante foi aspirado, deixando apenas o *pellet* sem nenhum resíduo líquido no tubo. Em todos os tubos foi realizada a dissolução dos lipídios da membrana celular com detergente não iônico, estabilização da cromatina e coloração com iodeto de propídio, de acordo com a metodologia do fabricante. Em seguida foi realizada a leitura no citômetro FACSCanto™ II (Becton, Dickinson Company, 10.000 eventos).

2.8 RT-qPCR quantitativa

A análise de expressão gênica foi realizada por PCR quantitativa em tempo real, pela metodologia de Sybr Green. Os iniciadores utilizados neste estudo foram desenhados usando o programa *Gene Runner* 3.05, de acordo com as sequências de RNAm dos genes alvos obtidos no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (Tabela 1). Como genes alvos foram avaliados: Interleucina-2 (*IL-2*); receptor de quimiocina (*CCR5*); receptor de lectina tipo C (*CLEC7A*); receptor delectina-1 (*ITGAM*); Fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*), Ciclina D1 (*CCND1*); quinases dependentes de ciclina (*CDK4* e *CDK2*); caspase3 (*CASP3*); *linfoma de células B2* (*BCL-XL*); Baculovirus iap de repetição (*BIRC5*); oncogene retroviral v- myc

(*C-MYC*). Como gene normalizador da reação foi utilizado o gene Gliceraldeído- 3- fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (Tabela 1).

As extrações do RNA total das culturas de linfócitos normais e tumorais submetidas aos tratamentos com o EPS, submetidos ao protocolo de pós tratamento, foram realizadas com o kit Purelink RNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs totais extraídos foram quantificados em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e os graus de pureza foram determinados pela relação A260nm/A280nm, sendo considerados puro no intervalo de 1,8 -2,0. A qualidade e integridade dos RNAs foram avaliadas em eletroforese de gel de agarose (1,5%).

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit Superscript III (Invitrogen, Life Technologies, USA) reverse transcriptase (Invitrogen) a partir de 1µl de RNA total (500ng), de acordo com a metodologia do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada em Termociclador Quantica Real Time PCR System (TECHNE; Staffordshire, UK). A amplificação por PCR de cada uma das amostras foi realizada em um volume final de 20 µL.

A reação de PCR foi realizada com 5,0 µL (100 ng / mL) do cDNA diluído, 10,0 µL de SYBR Green Master Mix (Invitrogen, Life Technologies, EUA), e 0,25 µL (10 pM) de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*). Cada reação foi realizada em triplicado. Em geral, os parâmetros de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de amplificação de 95°C durante 15 seg, 60 °C durante 15 s e 72 °C durante 30 s. A análise da curva de *melting* foi realizada no final da reação através de um aumento da temperatura de 55 °C a 95 ° C em passos de 0,5 °C a cada 5 s.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para cada gene analisado por RT-PCR quantitativa.

Categoria/Gene	*iniciadores
Reconhecimento de β glucan	
CCR5	F: 5' AGACCACCAACAGCCCTCA 3' R: 5' CACTTCCAACCCAAATCCAC 3'
CLEC7A	Invitrogen
ITGAM	Invitrogen
Cinética do ciclo celular	
CDK4	F: 5' CTTCTCTGTTTGGCTTTGC 3' R: 5' GGGCTCCACTGACTTCCTA 3'
C-MYC	F: 5' GGAAGTATGTGGAGCG 3' R: 5' TCGTTGAGAGGGTAGGG 3'
BCL-XL	F: 5' CAGCCGAGAGCCGAAAGG 3' R: 5' GAGGGTAGAGTGGATGGTC 3'
CDK2	Invitrogen
Apoptose	
CASP3	F: 5' CATCCAGTCGCTTTGTGC 3' R: 5' ATTCTGTTGCCACCTTTTCG 3'
BIRC5	F: 5' GACTTGTGTGTGATGAGAG 3' R: 5' TAGAATGGCTTTGTGCTTAG 3'
Immunomodulação	
IL-2	F: 5' GTCAAAGCATCATCTCAACAC 3' R: 5' TAGCAAACCATACATTCAACAA 3'
TNF-α	Invitrogen
Constitutivo	
GAPDH	F: 5' GGGCATCCTGGGCTACACT 3' R: 5' GGTCCAGGGTCTTACTC 3'

* As sequencias dos iniciadores foram desenhados utilizando-se o programa *Gene Runner* 3.05, com exceção dos iniciadores dos genes *CDK2*, *ITGAM*, *CLEC7A* e *TNF- α* que foram adquiridos da Invitrogen (sigma-aldrich, St Louise, MO, EUA)

2.9 Análises estatísticas

Todos os resultados estão expressos como média±desvio padrão. Todas as médias dos testes com células Jurkat foram obtidas a partir de três experimentos independentes. Já as médias originadas de testes com linfócitos normais foram obtidas de quatro indivíduos diferentes.

Nos testes de citometria de fluxo, após verificação da homogeneidade das variâncias, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($\alpha=0.05$), usando o software GraphPad Prism5 (San Diego, EUA). Os dados de expressão gênica foram submetidos a análise pelo método de quantificação relativa de Pfaffl [16], utilizando-se o gene *GAPDH* como gene de referência. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software REST[®] disponível em: <http://gene-quantification.de>

3. Resultados

3.1 Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo

Nas Figuras 1 e 2 estão apresentadas as análises da cinética do ciclo celular de células Jurkat submetidas a tratamento com DXR, EPS e associação entre DXR e EPS em três diferentes protocolos (pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento).

As células Jurkat mostraram a presença de três populações distintas de células: diplóides, aneuplóides e tetraplóides (Fig. 1), diferentemente dos linfócitos normais que eram 100% diploides (dados não mostrados).

Células Jurkat submetidas a tratamento apenas com EPS, DXR e nos protocolos de pré e tratamento simultâneo apresentaram predominância de população diplóide e baixa porcentagem de população tetraplóide (Fig.1). Entretanto, em condição de pós-tratamento, houve uma diminuição significativa da população diplóide nas fases G0/G1 e S em relação ao controle negativo (Fig. 2A) e um aumento significativo de população tetraplóide, onde 100% dessas células estavam na fase G0/G1 (Fig. 2B). A análise de outros tratamentos (botriosferana, DXR, protocolos de tratamento pré e simultâneo)

mostrou que as proporções de células nas três fases do ciclo celular foram estatisticamente semelhantes aos encontrados no grupo controle negativo.

As análises da cinética do ciclo celular de linfócitos humanos normais submetidos a tratamentos com EPS, DXR e associação de EPS + DXR (pré, simultâneo e pós-tratamento) estão apresentadas na Fig. 3. Os dados revelam a presença apenas de população diplóide em todos os tratamentos avaliados. Todos os tratamentos mantiveram proporções de células nas três fases do ciclo celular (G1, S e G2) estatisticamente semelhantes ao controle negativo. Comparando-se as populações diplóides dos linfócitos normais e tumorais é possível perceber que as células tumorais apresentaram, em todos os tratamentos, proporções maiores de células em fase S em relação às células normais, que por sua vez apresentaram uma fase G2 maior do que as tumorais.

A Fig. 4 mostra um teste realizado com células Jurkat submetidas a tratamento com botriosferana e DXR pré-incubados por 2, 4 e 6 horas, para se avaliar se algum tipo de complexo gerado pela interação destas substâncias seria capaz de promover a formação de células tetraplóides. A análise dos resultados mostrou uma redução da população diplóide e, simultaneamente, um aumento da população tetraplóide. Ambos os eventos foram tempo dependente.

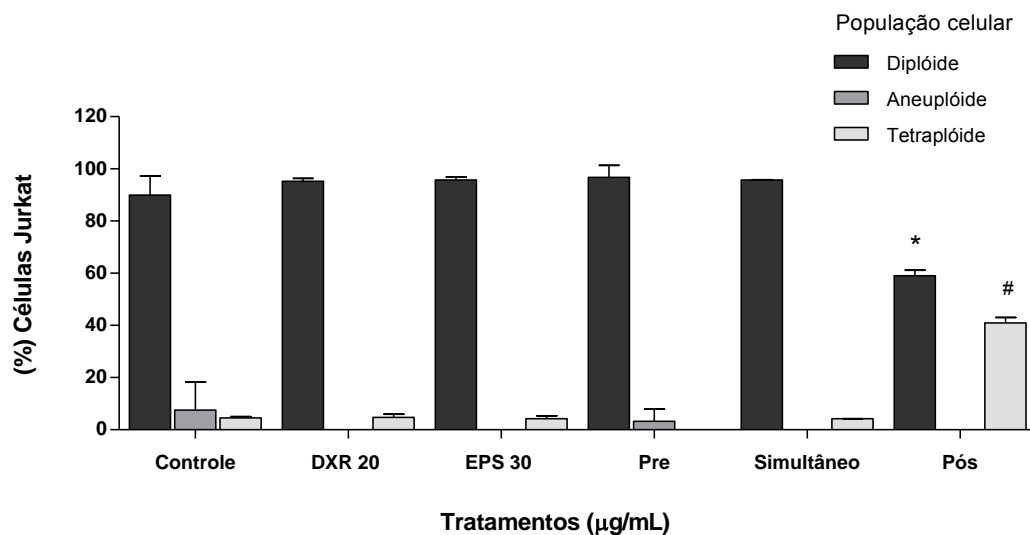


Figura 1: Populações de células Jurkat expostas a protocolo de tratamento com EPS individualmente ou associado com DXR. Controle: PBS-24h; DXR-2h; EPS-24h; Pré: EPS-22h seguido de DXR-2h; Simultâneo: EPS + DXR-2h; Pós: DXR-2h seguido de EPS-22h.

*Estatisticamente diferente da população diplóide do grupo controle ($P < 0,05$; ANOVA seguida pelo teste de Tukey). #Estatisticamente diferente da população tetraplóide do grupo controle ($P < 0,05$; ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

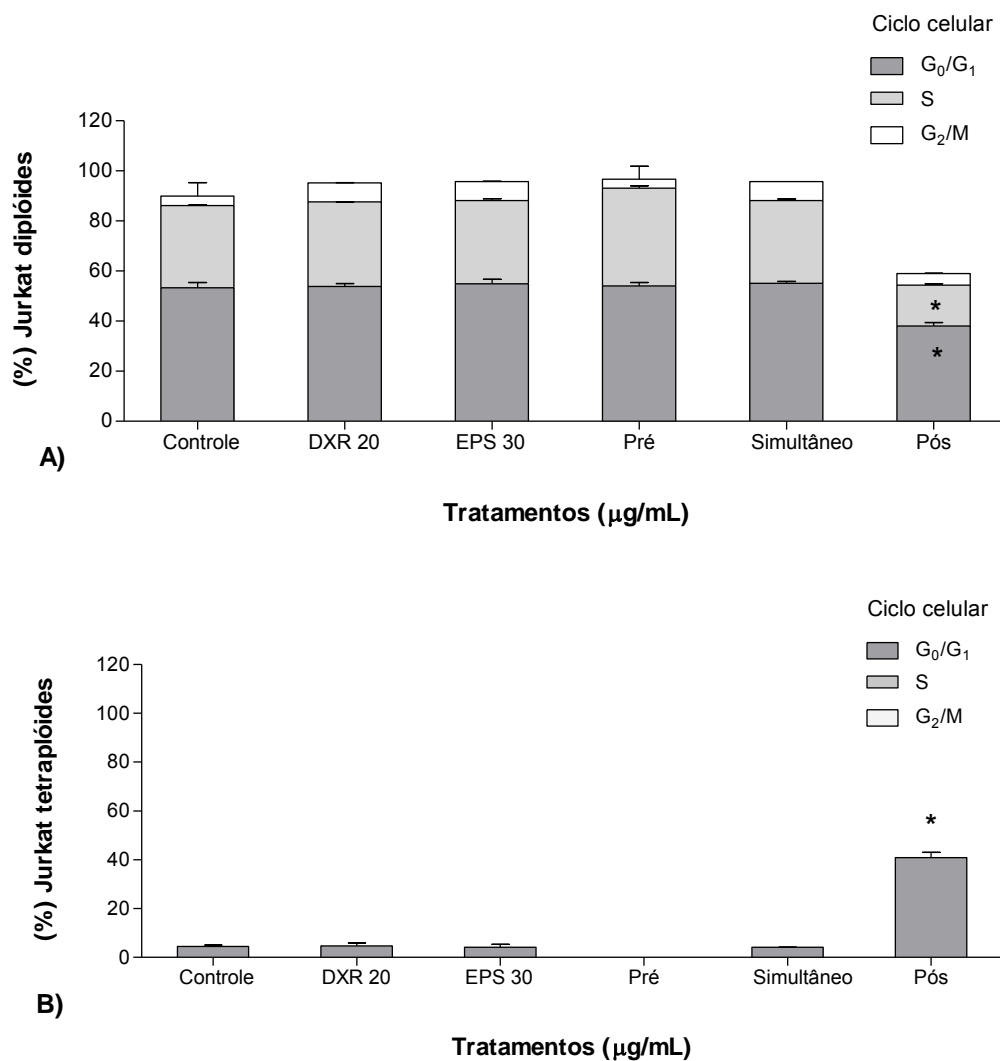


Figura 2: Distribuição no ciclo celular das células Jurkat tratadas com EPS individualmente ou em protocolos de associação com DXR. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. **2A:** População diplóide de células Jurkat. **2B:** População tetraplóide de células Jurkat
*Estatisticamente diferentes dos demais ($P < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

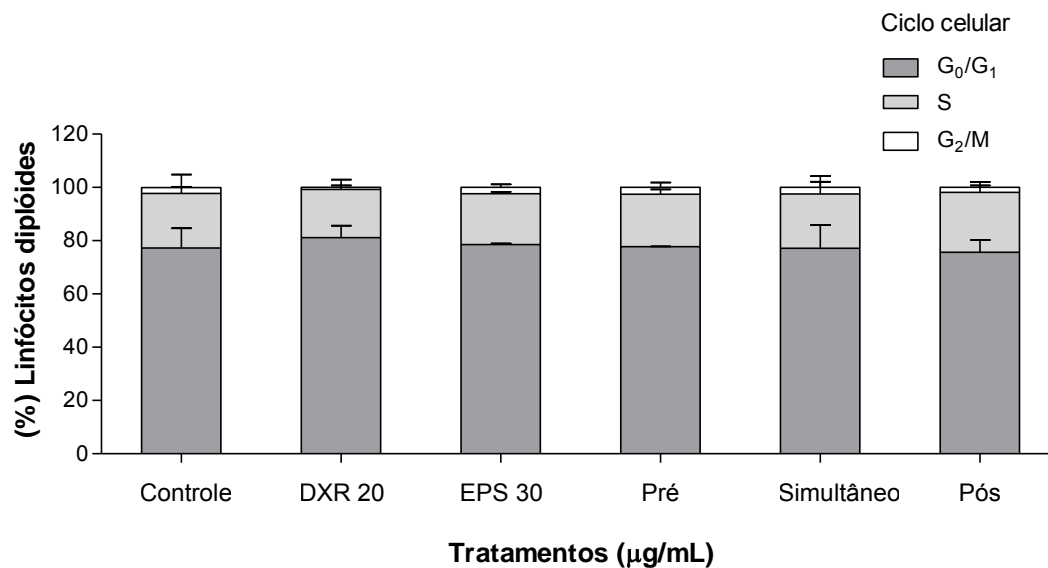


Figura 3: Porcentagens de linfócitos humanos diplóides em cada fase do ciclo celular determinadas por citometria de fluxo após tratamento por 24 h com PBS (Controle), Doxorubicina e Doxorubicina em associação com o botriosferana em protocolos de pré-tratamento (EPS-22h seguido de DXR-2h), tratamento simultâneo (EPS + DXR-2h) e pós tratamento (DXR-2h seguido de EPS-22). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

*Estatisticamente diferentes dos demais ($P < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

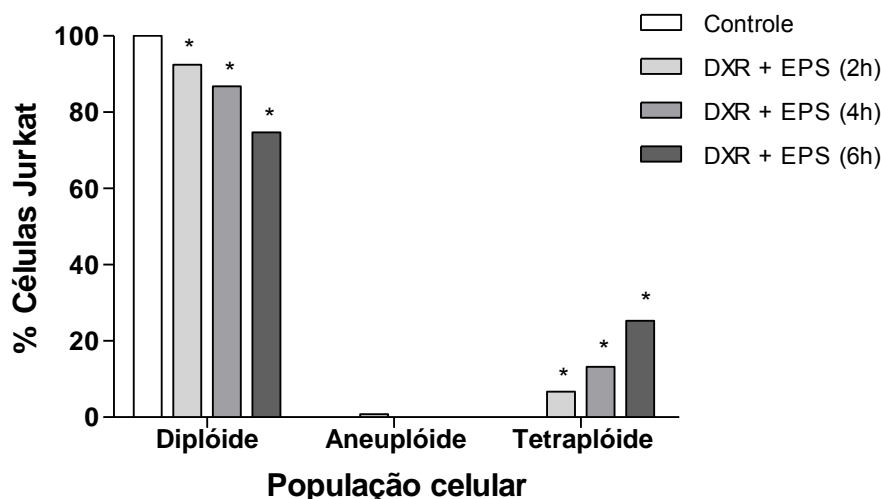


Figura 4: Frequências de diferentes populações de células Jurkat avaliadas por citometria de fluxo após tratamento por 24h com soluções previamente incubadas de EPS (30 µg/mL) associado à DXR (20 µg/mL) por 2, 4 ou 6 horas. Controle: tratamento com PBS.

* Estatisticamente diferente dos demais (ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$).

3.2 Quantitative RT-PCR

Os resultados da análise de expressão gênica por RT-qPCR em células Jurkat estão apresentados na Fig. 5. As análises dos genes *CCR5*, *CLEC7A* e *ITGAM*, envolvidos no reconhecimento de β -glucana, mostraram um aumento significativo dos transcritos de *CCR5* nas células Jurkat tratadas com DXR. Já nos tratamentos com EPS sozinho ou combinado com DXR, os perfis de transcrição destes genes não sofreram alterações significativas.

Os genes envolvidos no *checkpoint* G_1 , *CDK4*, *C-MYC* e *BCL-XL*, mostraram repressão significativa nas células Jurkat tratadas com EPS sozinho e em associação com a DXR. O tratamento com a DXR não foi capaz de alterar estes transcritos. Já o gene *CDK2*, envolvido na progressão da fase S, foi reprimido apenas quando as células foram tratadas com EPS.

A análise do gene *CASP3*, envolvidos no processo de apoptose, mostrou um aumento significativo de seus transcritos nas células tratadas com

DXR. O tratamento somente com EPS ou em associação com DXR não revelou alterações significativas no perfil transcricional deste gene.

Os três tipos de tratamentos de células Jurkat (botriosferana, DXR e DXR + botriosferana) modularam de forma diferentes a expressão dos genes associados com o processo de imunomodulação (*IL-2* e *TNF- α*). O gene de *IL-2* apresentou um aumento significativo nas células tratadas com DXR, mas o nível transcricional do gene *TNF- α* não foi alterado. Os tratamentos com o botriosferana, isolada ou associada com a DXR, não alteraram o perfil de transcrição do gene *IL-2*, mas mostrou uma repressão transcricional significativa do gene *TNF- α* .

Os resultados das análises do perfil de transcrição de linfócitos normais são mostrados na Fig. 6. Os três tratamentos (botriosferana, DXR, botriosferana + DXR) diminuíram a expressão dos transcritos dos genes de receptores de β -D-glucana, *CLEC7A* e *ITGAM*. O tratamento dos linfócitos humanos normais com o botriosferana, bem como o botriosferana + DXR, resultou na diminuição da regulação do gene *CCR5*, mas o tratamento com DXR resultou em um aumento do nível de transcrição desse gene.

A transcrição de genes envolvidos no G1 *checkpoint* (*CDK4* e *BCL-XL*), na fase S (*CDK2*), apoptose (*CASP3* e *BIRC5*), e na imunomodulação (*TNF- α*), não foram moduladas por tratamentos de linfócitos humanos normais com o botriosferana, DXR, ou o botriosferana + DXR. O gene *C-MYC* envolvido na proliferação celular e apoptose, no entanto, apresentou expressão diminuída em linfócitos humanos normais tratados com DXR.

O gene de *IL-2*, relacionado com a imunomodulação, foi significativamente regulado negativamente em células tratadas com o botriosferana. Nos demais tratamentos (DXR e botriosferana + DXR), não houve alteração significativa na expressão dos transcritos deste gene.

Figura 5: Expressão relativa dos transcritos gênicos *CCR5*, *IL-2*, *CDK2*, *CDK4*, *C-MYC*, *CASP3*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TNF*, *CLEC7A* e *ITGAM* por RT-qPCR em células Jurkat submetidas a tratamento com PBS (controle negativo); Doxorubicina (DXR); Botriosferana (EPS e tratamento com EPS seguido por DXR). Todos os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*

As comparações foram realizadas em relação ao grupo controle (PBS). *Estatisticamente diferente do grupo controle (P<0,05; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

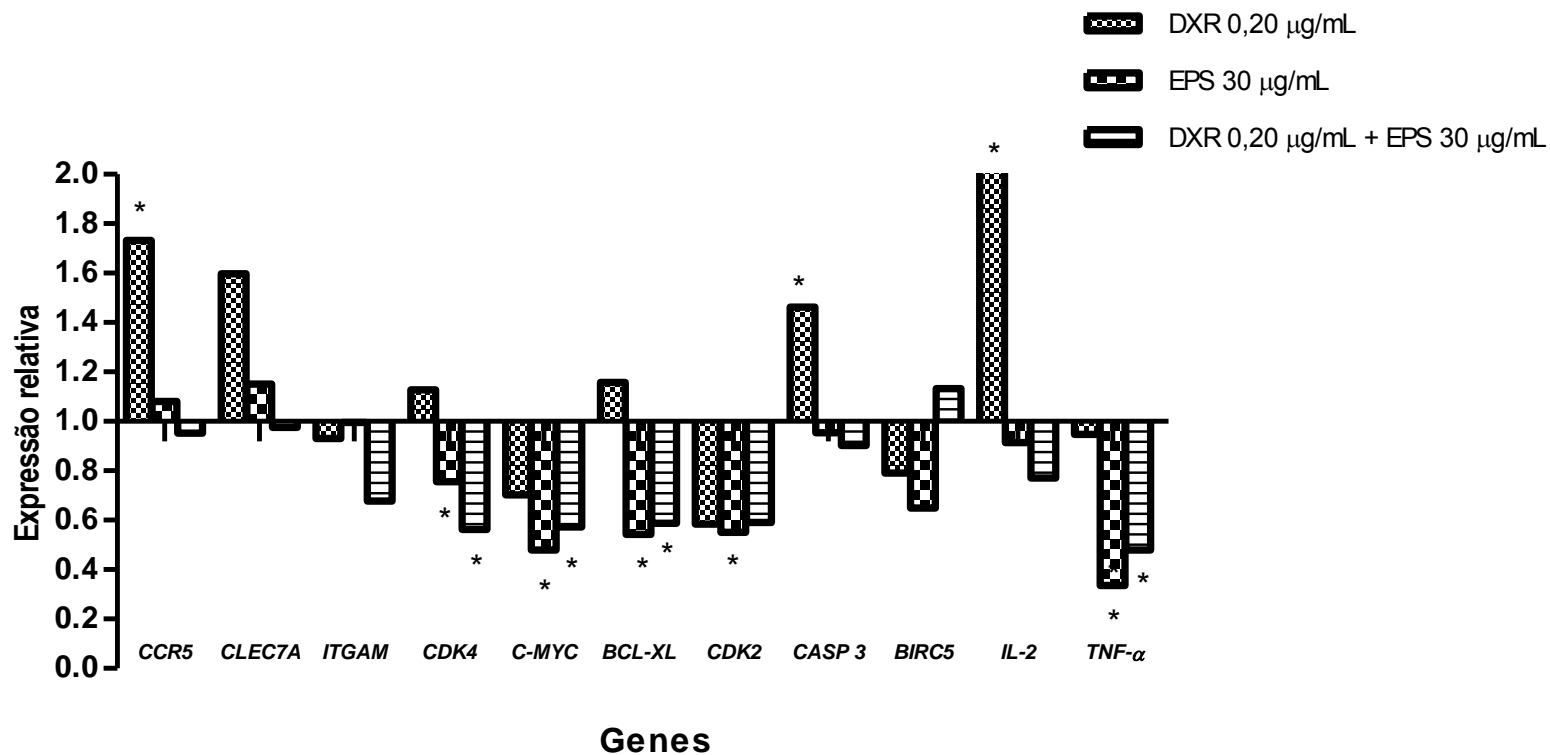
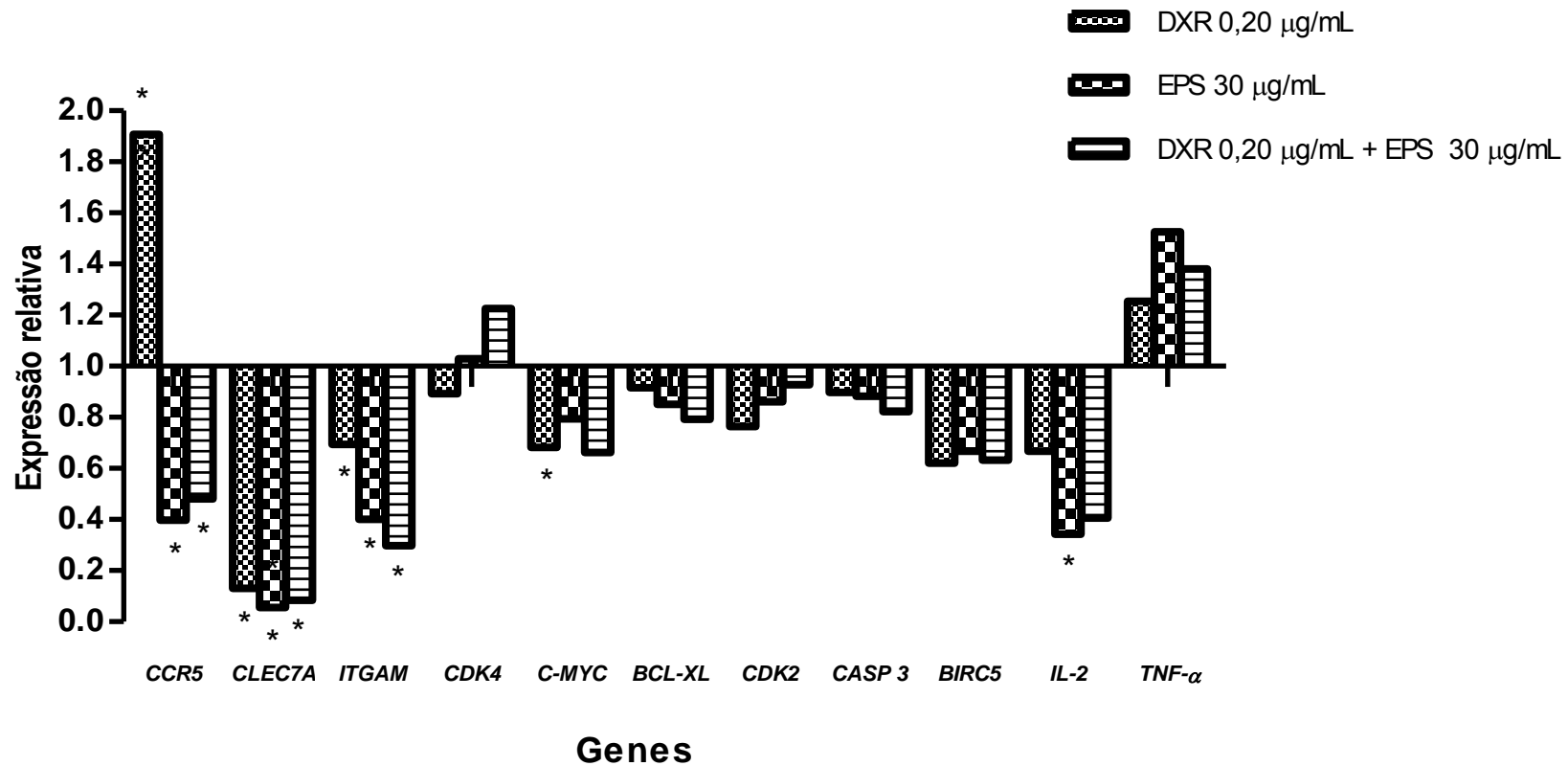


Figura 6: Expressão relativa dos transcritos gênicos *CCR5*, *IL-2*, *CDK2*, *CDK4*, *C-MYC*, *CASP3*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TNF*, *CLEC7A* e *ITGAM* por RT-qPCR em cultura de linfócitos humanos normais submetidas a tratamento com PBS (controle negativo); Doxorubicina (DXR; Botriosferana) e tratamento com EPS seguido por DXR). Todos os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*. As comparações foram realizadas em relação ao grupo controle (PBS). *Estatisticamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



4. Discussão

Várias β -glucanas isoladas de fungos, incluindo D-fração (uma fração β -D- glucana bioativas), o esquizofilano, o polissacarídeo-peptídeo (PSP) e o polissacarídeo K (PSK), que são eficientes agentes anticâncer [8].

O exopolissacarídeo botriosferana ((1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana), originado de *B. rhodina* MAMB-5, foi avaliado neste estudo em cultura de linfócitos normais e tumorais, por meio das técnicas de citometria de fluxo e transcriptoma (RT-qPCR).

A doxorubicina, um agente antitumoral do tipo antraciclina, é um indutor de danos celulares, tendo a capacidade de atuar sobre a topoisomerase II, tubulina e sobre os filamentos de tubulina e actina, desorganizando o citoesqueleto e promovendo a tetraploidia [17]. No entanto, a indução de uma população celular tetraplóide em células Jurkat após tratamentos individualizados apenas com DXR ou com EPS foi baixa, o que se contrapõe à elevada indução de tetraploidia (41%) obtida da associação do EPS com DXR sob condição de pós-tratamento (EPS+ DXR).

O resultado obtido nas células Jurkat com o botriosferana ((1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana) associado a DXR corresponde a um dado inédito na literatura e sugere que a interação ocorrida entre estes dois compostos (possivelmente através da formação de um complexo formado por ligações de H) seria a responsável pela ação diferencial do fármaco sobre o citoesqueleto. Para avaliar se esta interação DXR+EPS era a responsável pela indução da tetraploidia observada, foi realizado um as células Jurkat foram tratadas por 24h com uma solução contendo EPS e DXR pré-incubados por três diferentes tempos (2h, 4h e 6h) em estufa BOD a 36°C. Além da indução de tetraploidia os resultados ainda indicaram que este aumento da população tetraplóide formada após tratamento com a solução pré-incubada, era tempo dependente. Desta forma, é possível inferir que o complexo formado após a interação entre o botriosferana e DXR exerce um efeito sobre os microtúbulos, interrompendo a formação ou desestabilizando o fuso mitótico formado e, conseqüentemente, bloqueando a citocinese. No entanto, não podemos ignorar a possibilidade sugerida por Molinari et al. [17] que a interrupção da citocinese também pode

ocorrer através da ruptura dos filamentos de actina. Portanto, esta hipótese ainda necessita de experimentos adicionais para ser confirmada.

Compostos com propriedades antimitóticas causam a ruptura do fuso mitótico e induzem falhas na citocinese, que ativam o mecanismo *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC), um dos responsáveis por promover à parada e prolongamento da mitose [18]. Em seu trabalho para definir como células tumorais respondem a agentes antimitóticos, Gascoigne e Taylor (2008) [19] concluíram que, após algumas horas do tratamento, a maioria das células entrou em mitose e permaneceram nesta fase por um tempo prolongado antes de sofrerem um dos dois destinos, ou seja, saírem da mitose e retornarem à interfase ou morrerem em mitose.

No presente estudo as células Jurkat não pararam em mitose e, sim, migraram para a fase G1 da interfase. Nesta fase, segundo Gascoigne e Taylor (2008) [19], as células ainda podem exibir três destinos: morrerem, permanecerem em interfase ou entrarem em uma segunda mitose. Embora raro, algumas podem se dividir. Segundo Rieder e Maiato [18], tanto células normais como tumorais continuamente expostas a antimitóticos, quando saem do SAC e entram na fase G1 do ciclo celular são células 4n viáveis.

Os resultados do presente estudo corroboram esta hipótese, pois aproximadamente das 46% das células que entraram em mitose, apenas 5% permaneceram nesta fase e os 41% restantes romperam o mecanismo *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) da fase M e passaram para a fase G1 como células tetraplóides, onde permaneceram estacionadas. O fato das células Jurkat conseguirem romper os mecanismos do SAC e saírem da mitose pode caracterizar um possível mecanismo de resistência destas células ao composto derivado da interação da DXR com o EPS.

Nossos resultados corroboram os achados de Jordan et al.(1996) [21] em células HeLa (carcinoma cérvix uterina humana) e de Tao et al. (2005) com linhagens celulares humanas A2780 (carcinoma de ovário), HTC116 (carcinoma colorretal) e HT29 (adenocarcinoma de cólon) [20, 21], que explicaram tal fenômeno como uma adaptação ou evasão do ponto de checagem mitótico, onde a exposição prolongada de células tumorais ao Taxol induziu a saída dessas células da mitose, sem que ocorresse divisão celular, e permanência em estado tetraplóide. Apesar de Gascoigne e Taylor (2008) e

Brito e Rieder (2006) [19, 22] discutirem a participação da ciclina B1 neste processo, os mecanismos responsáveis pela evasão do SAC e, conseqüentemente, da fase M precisam ser melhor esclarecidos.

Alguns estudos têm mostrado que a apoptose induzida por alguns fármacos antimitóticos como o Nocadazol e Taxol requer a ativação do ponto de checagem mitótico (*Spindle Assembly checkpoint*), assim como o escape subsequente da parada na mitose pelas células tumorais [21, 23]. De acordo com Vogel et al. (2004) [24], as células tetraplóides que saem da mitose de forma aberrante desencadeiam uma resposta dependente do gene *TP53* em G1, a fim de se evitar maior poliploidização. Jordan et al. [20] afirmaram que as células que escapam do *checkpoint* do fuso mitótico e saem da fase M com característica tetraplóide tendem a entrar em apoptose em G1.

Apesar destes relatos, ainda não é possível afirmar se a subsequente ativação do *checkpoint* em G1 tem relação com o início da apoptose [25]. Os dados obtidos da análise por citometria de fluxo no presente estudo indicaram que 100% das células tetraplóides sob protocolo de pós-tratamento estavam na fase G0/G1. No entanto, a avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, tanto nas células Jurkat quanto nos linfócitos T normais, não evidenciou a presença de células na fase sub G0, que caracteriza células em morte celular.

A análise da expressão do gene *CASP3* também não confirmou a indução de apoptose nas células Jurkat em estudo, exceto quando tratadas apenas com a doxorrubina, onde foi possível detectar o aumento de transcritos deste gene. Neste caso a indução era esperada, já que a morte por apoptose é um importante mecanismo das drogas quimioterápicas [26]. A ativação de *CASP3* é necessária para a produção de *IL-2* em células T Jurkat ativadas. [27]. Nossos dados corroboram esta afirmação, pois o aumento dos níveis transcricionais do gene *IL-2* só foi encontrado em células T Jurkat tratadas apenas com a DXR. .

A repressão dos transcritos gênicos *TNF- α* em células Jurkat tratadas com EPS isolado ou associado com DXR confirma a ausência de células em morte celular (fase sub G0) detectada por citometria de fluxo. O aumento de expressão de *TNF- α* estaria associado a um aumento de sinalização para o processo apoptótico, já que estes transcritos codificam citocina pró-inflamatória mediadora do processo apoptótico [28].

A ausência de apoptose no presente estudo não parece estar relacionada ao fenômeno de rejeição à morte celular citado por Rebucci e Michiels [29], onde ocorreria uma superexpressão de proteínas anti-apoptóticas e inativação de genes pró-apoptóticos. . Ao contrário disso, foi observado que células Jurkat tratadas com EPS sozinho ou associado à DXR, apresentaram uma diminuição dos transcritos dos genes anti-apoptóticos *BCL-XL* e *C-MYC*.

O gene *BIRC5* normalmente está expresso em tecidos tumorais e superexpresso após quimioterapia na maioria dos tumores, tendo um papel chave na resistência a drogas antitumorais [30]. Os achados do presente estudo não evidenciaram alteração destes transcritos em nenhum dos tratamentos de células Jurkat, o que também enfraquece o possível mecanismo de resistência dessas células aos tratamentos realizados com EPS associado à Doxorrubicina.

Nos tratamentos das células Jurkat apenas com EPS foi possível verificar, por análise de expressão gênica, que esta molécula pode estar relacionada com a indução antiproliferativa, pois foi detectada a modulação negativa dos transcritos dos genes *CDK4*, *C-MYC* e *BCL-XL*, todos eles responsáveis pelo controle da proliferação celular, com atuação no *checkpoint* da fase G1 do ciclo celular. No tratamento associado EPS e DXR também foram modulados negativamente os genes *BCL-XL* e *CDK4*, sendo o último ainda mais reprimido que no tratamento com o EPS sozinho.

Este efeito antiproliferativo em G1, mais acentuado no tratamento associado das células Jurkat, pode estar associado com a parada do ciclo celular em G1 observada durante as análises por citometria de fluxo. Estes resultados reforçam ainda mais a ideia de que a combinação de EPS com o quimioterápico Doxorrubicina desencadeia uma resposta diferente e intensa do efeito antitumoral exercido por este quimioterápico. A repressão significativa do transcrito gênico *CDK2* no tratamento das células Jurkat apenas com EPS não foi suficiente para interrupção do ciclo celular na fase S, pois os dados de citometria indicaram que não houve um aumento significativo das células nesta fase do ciclo celular.

De forma geral o perfil transcricional dos receptores de β -glucana, *ITGAM* e *CLEC7A*, mostrou baixa expressão em todos os tratamentos realizados em linfócitos normais e não mostraram alterações na transcrição

destes genes sob qualquer das condições de tratamento avaliadas para as células Jurkat. Estes resultados sugerem que o mecanismo de reconhecimento desta β -glucana possivelmente está sendo realizado por outro receptor.

O aumento dos transcritos do gene *CCR5* observado nas células T normal e tumoral, apenas tratadas com DXR e a repressão ocorrida deste transcrito em tratamentos com EPS sozinho ou associado à DXR na célula T normal, pode indicar um possível mecanismo molecular da ação do Botriosferana. É provável que esta molécula tenha afinidade de ligação ao receptor CCR5 e promova a sua inibição. Segundo Weitzenfeld et al. [31], a alta expressão do gene *CCR5* é associada à pró-malignidade e ao crescimento tumoral.

5. Conclusões

Os efeitos antiproliferativos do botriosferana em associação com o antineoplásico Doxorrubicina mostraram-se seletivos para células T leucêmicas. Seus mecanismos moleculares de atuação parecem estar envolvidos com repressão de genes relacionados à fase G1 do ciclo celular. Também indicam um possível caminho para novos estudos que investiguem a relação entre o botriosferana, sozinho ou associado com DXR, com o receptor CCR5.

As alterações específicas que a associação do EPS com DXR promoveram na dinâmica dos microtúbulos do fuso mitótico merecem investigações posteriores que esclareçam tal atividade aneugênica, assim como sua possível especificidade antitumoral. Estes resultados, somados aos anteriormente descritos por nosso grupo, indicam o botriosferana como um forte candidato para ser usado em terapia adjuvante do câncer, quando combinado com Doxorrubicina em protocolo de pós-tratamento.

6. Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo no. 478839/2012-0). Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de doutorado concedida a Malini, M.C. e ao CNPq pelas bolsas PQ concedidas para Cólus, I.M.S e Antunes, L.M.G. Agradecem também à Ms. Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo pelo auxílio na técnica de isolamento de linfócitos.

Os autores agradecem aos voluntários que doaram o sangue e ao apoio técnico da Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo, Jefferson Codognotto, Regislaine Valéria Burim, Fabiana da Silva Lima e ao Dário Tormena.

Referências

1. Ye S, Liu F, Wang J, Wang H, Zhang M: **Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6.** *Carbohydrate Polymers* 2012, **87**(1):764-770.
2. Mishra A, Kavita K, Jha B: **Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*.** *Carbohydrate Polymers* 2011, **83**(2):852-857.
3. Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P: **The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence.** *Journal of Functional Foods* 2012, **4**(4):687-709.
4. Munemoto, Iida, Abe, Saito, Fujisawa, Kasahara, Mitsui, Asada, Miura: **Significance of postoperative adjuvant immunotherapy after curative resection of colorectal cancers: Association between host or tumor factors and survival.** *International Journal of Oncology* 2002, **20**(2):403-411.
5. Bohn JA, BeMiller JN: **(1→3)-β-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships.** *Carbohydrate Polymers* 1995, **28**(1):3-14.
6. Kim KS, Yun HS: **Production of soluble β-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**(3):496-500.
7. Zaidman B-Z, Yassin M, Mahajna J, Wasser S: **Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **67**(4):453-468.
8. Zong A, Cao H, Wang F: **Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research.** *Carbohydrate Polymers* 2012, **90**(4):1395-1410.
9. Barbosa AM, Steluti RM, Dekker RFH, Cardoso MS, Corradi da Silva ML: **Structural characterization of *Botryosphaeran*: a (1→3;1→6)-β-d-glucan**

- produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research* 2003, **338**(16):1691-1698.
10. Miranda CCBO, Dekker RFH, Serpeloni JM, Fonseca EAI, Cólus IMS, Barbosa AM: **Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2008, **42**(2):172-177.
 11. Miranda-Nantes CCBO, Fonseca EAI, Zaia CTBV, Dekker RFH, Khaper N, Castro IA, Barbosa AM: **Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats.** *Mycobiology* 2011, **39**(3):187-193.
 12. Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, Alrokayan SA, Kumar S: **Targeted anticancer therapy: Overexpressed receptors and nanotechnology.** *Clinica Chimica Acta* 2014, **436**(0):78-92.
 13. Steluti RM, Giese EC, Piggato MM, Sumiya AFG, Covizzi LG, Job AE, Cardoso MS, De Lourdes Corradi Da Silva M, Dekker RFH, Barbosa AM: **Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features.** *Journal of Basic Microbiology* 2004, **44**(6):480-486.
 14. Somogyi M: **A new reagent for the determination of sugars.** *Journal of Biological Chemistry* 1945, **160**(1):61-68.
 15. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.** *Analytical Chemistry* 1956, **28**(3):350-356.
 16. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**(9):e45-e45.
 17. Molinari A, Calcabrini A, Crateri P, Arancia G: **Interaction of anthracyclinic antibiotics with cytoskeletal components of cultured carcinoma cells (CG5).** *Experimental and Molecular Pathology* 1990, **53**(1):11-33.
 18. Rieder CL, Maiato H: **Stuck in Division or Passing through: What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle Assembly Checkpoint.** *Developmental Cell* 2004, **7**(5):637-651.
 19. Gascoigne KE, Taylor SS: **Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs.** *Cancer Cell*, **14**(2):111-122.
 20. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Brent Derry W, Copp H, Wilson L: **Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death.** *Cancer Research* 1996, **56**(4):816-825.
 21. Tao W, South VJ, Zhang Y, Davide JP, Farrell L, Kohl NE, Sepp-Lorenzino L, Lobell RB: **Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage.** *Cancer Cell* 2005, **8**(1):49-59.
 22. Brito DA, Rieder CL: **Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint.** *Current Biology*, **16**(12):1194-1200.
 23. Kasai T, Iwanaga Y, Iha H, Jeang K-T: **Prevalent Loss of Mitotic Spindle Checkpoint in Adult T-cell Leukemia Confers Resistance to Microtubule Inhibitors.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(7):5187-5193.

24. Vogel C, Kienitz A, Hofmann I, Muller R, Bastians H: **Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy.** *Oncogene* 2004, **23**(41):6845-6853.
25. Schmidt M, Bastians H: **Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs.** *Drug Resistance Updates*, **10**(4):162-181.
26. Ren L, Perera C, Hemar Y: **Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review.** *Food & Function* 2012, **3**(11):1118-1130.
27. Posmantur R, Wang KKW, Gilbertsen RB: **Caspase-3-Like Activity Is Necessary for IL-2 Release in Activated Jurkat T-cells.** *Experimental Cell Research* 1998, **244**(1):302-309.
28. Kassouf N, Thornhill MH: **Oral cancer cell lines can use multiple ligands, including Fas-L, TRAIL and TNF- α , to induce apoptosis in Jurkat T cells: Possible mechanisms for immune escape by head and neck cancers.** *Oral Oncology* 2008, **44**(7):672-682.
29. Rebucci M, Michiels C: **Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy.** *Biochemical Pharmacology* 2013, **85**(9):1219-1226.
30. Liu J, Wang Y, Jiang JI, Kong R, Yang Y-M, Ji H-F, Shi Y-Z: **Inhibition of survivin expression and mechanisms of reversing drug resistance of human lung adenocarcinoma cells by siRNA.** *Chinese Medical Journal* 2010, **123**(20):2901-2907.
31. Weitzenfeld P, Ben-Baruch A: **The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer.** *Cancer Letters* 2014, **352**(1):36-53.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo apontaram o exopolissacarídeo isolado do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB5 como um composto que apresentou baixo perigo mutagênico e genotóxico em, respectivamente, *S. typhimurium* e linfócitos humanos. Também foi observada uma atividade antigenotóxica seletiva frente aos danos induzidos em linfócitos normais pelo agente alquilante MMS; bem como seu efeito antiproliferativo seletivo em linfócitos tumorais, quando associado ao antineoplásico Doxorrubicina.

Os mecanismos moleculares de atuação deste EPS parecem estar envolvidos com repressão de genes relacionados à fase G1 do ciclo celular, indicando a necessidade novos estudos que investiguem a relação entre o Botriosferana, sozinho ou associado com DXR, com o receptor CCR5.

As alterações específicas que a associação do EPS com DXR promoveram na dinâmica dos microtúbulos do fuso mitótico merecem investigações posteriores que esclareçam tal atividade aneugênica, assim como sua possível especificidade antitumoral. Estes resultados, somados aos anteriormente descritos por nosso grupo, contribuirão para a validação de seu uso em vários setores da economia. O presente estudo ainda estimula a realização de futuras investigações que conduzam a um melhor entendimento sobre os mecanismos de proteção do Botriosferana em linfócitos humanos normais após tratamento com agentes alquilantes. Os resultados do presente estudo permitem considerar o Botriosferana como um forte candidato para ser usado em terapia adjuvante do câncer, quando combinado com Doxorrubicina em protocolo de pós-tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes**. 2013.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. 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, n. 2, p. 93-96, 1996. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb00038.x> >.

BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-d-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691-1698, 2003. ISSN 0008-6215. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621503002404> >.

BERNER, M. D. et al. IFN-γ primes macrophages for enhanced TNF-α expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate β-glucan. **Immunology Letters**, v. 98, n. 1, p. 115-122, 2005. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247804002925> >.

BISEN, P. S. et al. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 2419-2430, 2010. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2010/00000017/00000022/art00006> > <http://dx.doi.org/10.2174/092986710791698495> >.

BISHOP, W. E.; CLARKE, D. P.; TRAVIS, C. C. The Genomic Revolution: What Does It Mean for Risk Assessment? **Risk Analysis**, v. 21, n. 6, p. 983-988, 2001. ISSN 1539-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/0272-4332.216167> >.

BONGIOVANI, R. A. M. Nota Científica: Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 01, p. 53-59, 2009. ISSN 1981-6723.

BORCHERS, A. T. et al. Mushrooms, tumors, and immunity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, n. 4, p. 281-293, 1999. ISSN 1525-1373.

BRANDI, J. et al. Chemical Modification of Botryosphaeran: Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Water-Soluble Sulfonated (1→3)(1→6)-β-D-Glucan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1036 - 1042, 2011.

BREHM-STECHER, B. F. Flow Cytometry. In: TORTORELLO, C. A. B. L. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p.943-953. ISBN 978-0-12-384733-1.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 311-315, 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761303002334> >.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007. ISSN 0953-7562. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756207000573> >.

CHIHARA, G. et al. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an Edible Mushroom). **Cancer Research**, v. 30, n. 11, p. 2776-2781, November 1, 1970. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/30/11/2776.abstract> >.

COMAS-RIU, J.; RIUS, N. Flow cytometry applications in the food industry. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 999-1011, 2009/08/01 2009. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0608-x> >.

CORRADI DA SILVA, M. D. L. et al. Purification and structural characterisation 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. 61, n. 1, p. 10-17, 2005. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861705000238> >.

CORRADI DA SILVA, M. D. L. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100017&nrm=iso >.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434 - 447, 2010.

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 and Microbial Technology**, v. 28, n. 1, p. 81-88, 2001. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S01410229000274X> >.

DI SOTTO, A. et al. Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 16-22,

2014. ISSN 0273-2300. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230013001876> >.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191-205, May 1, 2008 2008. Disponível em: <

<http://mutage.oxfordjournals.org/content/23/3/191.abstract> >.

EASTMOND, D. A. et al. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 341-349, July 1, 2009 2009. Disponível em: <

<http://mutage.oxfordjournals.org/content/24/4/341.abstract> >.

ESCOBAR, P. A. et al. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 2, p. 99-118, 2013. ISSN 1383-5742. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574212000671> >. Acesso em: 2013/6//.

FALCO, A. et al. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1051-1057, 2012. ISSN 1050-4648. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464812000800> >.

FALCO, A. et al. β -Glucan-supplemented diets increase poly(I:C)-induced gene expression of Mx, possibly via Tlr3-mediated recognition mechanism in common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, p. 494-502, 2014. ISSN 1050-4648. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464813008644> >.

FIKROVÁ, P. et al. Application of the comet assay method in clinical studies.

Wiener klinische Wochenschrift, v. 123, n. 23-24, p. 693-699, 2011/12/01 2011. ISSN 0043-5325. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00508-011-0066-0> >.

GANTNER, B. N. et al. Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107-1117, 2003. ISSN 0022-1007

1540-9538. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193968/> >.

GIESE, E. C. et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International Journal of**

Biological Macromolecules, v. 72, n. 0, p. 125-130, 2015. ISSN 0141-8130.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014005212> >.

- HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, January 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://mutage.oxfordjournals.org/content/18/1/45.abstract> >.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immun**, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005. ISSN 1466-4879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6364190> >.
- JUAN-GARCÍA, A. et al. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, n. 0, p. 40-59, 2013. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513001130> >.
- Kada T, Inoue T, Namiki N (1982) Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski EJ (ed) Environmental mutagenesis and plant biology. Praeger, New York, pp 137–151
- KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, n. 0, p. 588-598, 2015. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014006059> >.
- KERCHE, L. **Determinação in vitro de possíveis efeitos genotóxicos e protetores de B- glucana botriosferana em células de mamíferos**. 2010. 99 Mestrado, Universidade Estadual de Londrina
- KIRKLAND, D. et al. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 584, n. 1–2, p. 1-256, 2005. ISSN 1383-5718. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571805000835> >.
- KREWSKI, D. et al. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 13, n. 2-4, p. 51-138, 2010/06/17 2010. ISSN 1093-7404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2010.483176> >. Acesso em: 2015/03/28.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95-125, 2006. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299705000907> >. Acesso em: 2006/6//.
- LEBRON, F. et al. Pneumocystis carinii Cell Wall β -Glucans Initiate Macrophage Inflammatory Responses through NF- κ B Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 25001-25008, July 4, 2003 2003. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/278/27/25001.abstract> >.

LIU, Y. et al. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 370-375, 2009. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709000319> >.

MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Beta-glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining / Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina : Ciências Agrárias**, 2008. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2800> >.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983. ISSN 0165-1161. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165116183900109> >.

MENDES, S. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 305-309, 2009. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181300900141X> >.

MIHAILOVIĆ, M. et al. β -Glucan administration to diabetic rats alleviates oxidative stress by lowering hyperglycaemia, decreasing non-enzymatic glycation and protein O-GlcNAcylation. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1226-1234, 2013. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464613001126> >.

MIRANDA-NANTES, C. C. B. O. et al. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 187-193, 2011. ISSN 1229-8093. Disponível em: < <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5941%2FMYCO.2011.39.3.187> >.

MIRANDA, C. C. B. O. et al. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 172-177, 2008. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813007002590> >.

MORI, M. P. **Avaliação *in vitro* das atividades mutagênicas, antimutagênicas e modulação da viabilidade celular do exopolissacarídeo botriosferana**. 2008. 55 Monografia., Universidade Estadual de Londrina

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510700000646> >.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, n. 0, p. 231-250, 2015. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898114004483> >.

NOLAN, G. P. What's wrong with drug screening today. **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 4, p. 187-191, 2007. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio0407-187> >.

NOVAIS, C. M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 7, n. 33, p. 10-13, 2004.

O'HARA, D. M. et al. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 363, n. 2, p. 120-134, 2011. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175910002905> >.

OECD. **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test**. OECD Publishing, 1997. Disponível em: < <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf> >.

OECD. **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**. OECD Publishing, 2014. Disponível em: < </content/book/9789264224438-en;jsessionid=brq4v8mg9tn2.x-oecd-live-02> <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224438-en> >.

OECD. **Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. OECD Publishing, Disponível em: < </content/book/9789264224179-en> <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179-en> >.

OHL, F. et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 12, p. 1014-1024, 2005/12/01 2005. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-005-0703-z> >.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X8490411X> >.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/9/e45.abstract> >.

PILLEMER, L.; ECKER, E. E. ANTICOMPLEMENTARY FACTOR IN FRESH YEAST. **Journal of Biological Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 139-142, January 1, 1941 1941. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/137/1/139.short> >.

RIGGI, S. J.; DI LUZIO, N. R. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. **American Journal of Physiology -- Legacy Content**, v. 200, n. 2, p. 297-300, February 1, 1961 1961. Disponível em: < <http://ajplegacy.physiology.org/content/200/2/297.abstract> >.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 100-108, 2010. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009008923> >.

SEVIOUR, R. J. et al. Production of Pullulan and other Exopolysaccharides by Filamentous Fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 279-298, 1992. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07388559209069196> >.

SHIBATA, M. et al. [PSK decreased FOLFOX4-induced peripheral neuropathy and bone marrow suppression in patients with metastatic colorectal cancer]. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 38, n. 5, p. 797-801, 2011. ISSN 0385-0684.

SIMMONS, P. T.; PORTIER, C. J. Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 6, p. 903-905, June 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://carcin.oxfordjournals.org/content/23/6/903.abstract> >.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650> >.

SIROTA, N. P. et al. Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 770, n. 0, p. 16-22, 2014. ISSN 1383-5718. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571814001508> >.

SKRZYPSKI, M. Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: Lung cancer perspective. **Lung Cancer**, v. 59, n. 2, p. 147-154, 2008. Disponível em: < [http://www.lungcancerjournal.info/article/S0169-5002\(07\)00676-9/abstract](http://www.lungcancerjournal.info/article/S0169-5002(07)00676-9/abstract) >. Acesso em: 2015/02/01.

SNYDER, R. D. An update on the genotoxicity and carcinogenicity of marketed pharmaceuticals with reference to in silico predictivity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, n. 6, p. 435-450, 2009. ISSN 1098-2280. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/em.20485> >.

SOARES, R. et al. Maitake (D Fraction) Mushroom Extract Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells by BAK-1 Gene Activation. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 6, p. 563-572, 2011/06/01 2011. ISSN 1096-620X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2010.0095> >. Acesso em: 2015/02/01.

SNUSTAD, P. SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. 4^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 778p, 2008.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 480-486, 2004. ISSN 1521-4028. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200410415> >.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792-809, 2013. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712009952> >.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. ISSN 1098-2280. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J) >.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: IN: RIBEIRO, L. R. S., D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Ulbra: Canoas, 2003. p.81-112.

USKOKOVIĆ, A. et al. Administration of a β -glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1966-1974, 2013. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461300217X> >.

VETVICKA, V.; THORNTON, B. P.; ROSS, G. D. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 1, p. 50-61, 1996. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.jci.org/articles/view/118777> >.

VILLANI, P. et al. Evaluation of a modified comet assay to detect DNA damage in mammalian sperm exposed in vitro to different mutagenic compounds. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 44-49, 2010. ISSN 0890-6238. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623809003177> >.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276-284, 2008. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938407004702> >.

WAN, J. M.-F. et al. Polysaccharopeptides derived from *Coriolus versicolor* potentiate the S-phase specific cytotoxicity of Camptothecin (CPT) on human leukemia HL-60 cells. **Chinese Medicine**, v. 5, p. 16-16, 2010. ISSN 1749-8546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874562/> >.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). v. 1, n. 1, p. 31-62, 1999-03-01 1999. Disponível em: < <http://dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,6f35eac6176a1b5,3265072d688f53ee.html> >.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; DOWNES, C. S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 153-162, May 1, 2008 2008. Disponível em: < <http://mutage.oxfordjournals.org/content/23/3/153.abstract> >.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990. ISSN 0165-1110. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016511109090039E> >.

WENG, B. B.-C. et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 910-916, 2011. ISSN 0278-6915. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510007519>.

WILCOX, P. et al. Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains. **Mutagenesis**, v. 5, n. 3, p. 285-292, May 1, 1990 1990. Disponível em: < <http://mutage.oxfordjournals.org/content/5/3/285.abstract> >.

WILLMENT, J. A.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Characterization of the Human β -Glucan Receptor and Its Alternatively Spliced Isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43818-43823, November 23, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/276/47/43818.abstract> >.

WILSON, V. S. et al. Utilizing toxicogenomic data to understand chemical mechanism of action in risk assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 3, p. 299-308, 2013. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11000342> >.

YANPAISAN, W.; KING, N. J. C.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 1, p. 3-27, 1999. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975098000147> >.

YE, S. et al. Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 764-

770, 2012. ISSN 0144-8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711007417> >.

YUE, L. et al. A polysaccharide from *Agaricus blazei* attenuates tumor cell adhesion via inhibiting E-selectin expression. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1326-1333, 2012. ISSN 0144-8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712001415> >.

ZAIDMAN, B.-Z. et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 453-468, 2005/06/01 2005. ISSN 0175-7598. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1787-z> >.

ZEIGER, E.; MORTELMANS, K. The Salmonella (Ames) Test for Mutagenicity. In: (Ed.). **Current Protocols in Toxicology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471140856.

ZEKOVIĆ, D. B. et al. Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 205-230, 2005. Disponível em: <
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/07388550500376166> >.

ZHANG, M. et al. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β-glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 4, p. 455-462, 2006. ISSN 0144-8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861706001871> >.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395-1410, 2012. ISSN 0144-8617. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712006820> >.

ANEXOS

A) Parecer do Comitê de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 055/2013
kms

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2013.

À

Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezada Professora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 121ª reunião ordinária realizada em 20/09/2013, o projeto de pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E PROTETOR DO EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA SOBRE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO *IN VITRO* E *IN VIVO*", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 314.

Informamos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROF.ª DR.ª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

B) Termo de consentimento livre e esclarecido dos voluntários

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você a participar de um projeto de pesquisa que será desenvolvido no Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O título do projeto é “*Investigação dos efeitos imunomodulador e protetor do exopolissacarídeo botriosferana sobre marcadores do estresse oxidativo in vitro e in vivo*”. As responsáveis pela pesquisa são as Profas. Dras. Lusânia Maria Greggi Antunes e Ilce Mara de Syllos Cólus, e também sua orientada Maressa Cristiane Malini de Lima, que será a responsável pela apresentação e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A justificativa para a realização da pesquisa é o estudo dos produtos naturais produzidos pelos micro-organismos (fungos), que podem apresentar algum tipo de efeito sobre as células e os tecidos, com potencial de descoberta de compostos que poderão atuar como novos medicamentos. Assim, como parte da identificação dos compostos produzidos por estes micro-organismos, é preciso investigar seus efeitos em células humanas. Esta pesquisa poderá esclarecer se um composto produzido por um fungo específico é capaz de matar as células do câncer (chamadas de células cancerosas) sem causar a morte das células humanas saudáveis (células normais que não fazem parte do tumor). O sujeito da pesquisa não terá qualquer contato com o composto testado, pois todo o tratamento será realizado no sangue retirado do voluntário.

Os prováveis benefícios do estudo será o melhor conhecimento das atividades de compostos isolados dos micro-organismos, que futuramente poderão ser usados no desenvolvimento de novos medicamentos.

Informamos que a sua participação será voluntária, e que você não receberá pagamento para participar da pesquisa. Você poderá retirar o seu consentimento e desistir de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Uma vez que seu consentimento for retirado antes da publicação dos resultados, os dados referentes à sua amostra de sangue serão retirados dos resultados finais. Garantimos que a sua intimidade e privacidade não serão divulgadas, as informações serão secretas e os dados da pesquisa, que serão apresentados em trabalhos e eventos científicos, não informarão o seu nome ou suas iniciais. Garantimos também que este termo será elaborado em duas vias, sendo que você receberá uma das vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após as assinaturas. Se concordar em participar da pesquisa você não entrará em contato direto com os micro-organismos. Você será submetido a uma colheita de 10 mL de sangue (três vezes, com intervalos de 10 dias), com seringa e agulhas descartáveis, realizada por profissional da área da saúde e com experiência em exames de sangue. Os riscos são mínimos, com o desconforto de uma punção venosa, sendo que a formação de hematoma seria a complicação mais frequente da punção venosa periférica. As amostras de sangue deste trabalho serão utilizadas somente para esta pesquisa, ficarão sob a guarda dos pesquisadores e não serão armazenadas, sendo descartadas após a realização dos testes de acordo com as boas práticas de laboratório.

Caso precise de mais esclarecimentos ou sinta necessidade de conversar com os pesquisadores, você poderá fazê-lo pelos telefones abaixo. Inclusive, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), no endereço Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 –

Ribeirão Preto – SP. Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br. Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____
R.G. nº: _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre o projeto de pesquisa intitulado “*Investigação dos efeitos imunomodulador e protetor do exopolissacarídeo botriosferana sobre marcadores do estresse oxidativo in vitro e in vivo*”, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos a que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Sujeito de pesquisa

Pesquisador Responsável
Lusânia Maria Gregg Antunes
CPF 180.988.908-13
Fone: (16) 3602-4186
Celular: (16) 8116-7506

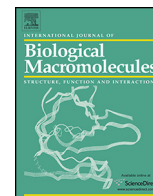
Pesquisador Participante
Ilce Mara de Syllos Cólus
CPF 029.734.628-86
Fone: (16) 3602-4186
Celular: (16) 8113-1918

Pesquisador Participante
Maressa C. Malini de Lima
CPF 104.321.467-41
Fone: (16) 3602-4713
Celular: (43) 9918-0380

C) Artigo publicado

O manuscrito 2 foi submetido para publicação anteriormente à defesa da tese de doutorado, conforme normas do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL. Após a defesa recebemos o manuscrito com as sugestões dos *referees* da revista. A correção foi efetuada incluindo-se, também, aquelas sugestões recebidas da banca examinadora.

O artigo foi aceito, publicado e já está disponível para consulta pública. Assim, está incluído abaixo, na forma final já publicada pelo *International Journal of Biological Macromolecules*.



Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1→3)(1→6)-β-d-glucan in human lymphocytes

Maressa Malini^a, Marilesia Ferreira de Souza^a, Marcelo Tempesta de Oliveira^a, Lusânia Maria Greggi Antunes^b, Suely Gomes de Figueiredo^c, Aneli M. Barbosa^{d,e}, Robert F.H. Dekker^e, Ilce Mara de Syllos Cólus^{a,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil

^c Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – ES, Brazil

^d Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brazil

^e Biorefining Research Institute, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2015

Received in revised form 2 March 2015

Accepted 10 March 2015

Available online 18 March 2015

Keywords:

Fungal β-D-glucan
Human lymphocytes
Doxorubicin

ABSTRACT

There is growing interest in the anticancer and immunomodulatory potential of fungal β-D-glucans. In the present study, the modulation of gene expression via RT-qPCR and cell cycle kinetics via flow cytometry were assessed in human normal and tumor (Jurkat) lymphocytes after treatment with botryosphaeran (a fungal (1→3)(1→6)-β-D-glucan) from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Cell cultures were treated with botryosphaeran either alone, or in combination with doxorubicin (DXR), in a post-treatment protocol. The expression of genes involved in immunomodulatory processes, apoptosis and cell cycle control, as well as β-D-glucans cell receptors were assessed. Flow cytometry analysis identified tetraploid Jurkat cells in G₁ phase when treated with botryosphaeran combined with DXR. This antiproliferative effect in G₁ may be associated with down-regulation of the expression of genes involved in the G₁ checkpoint. The repression of the *CCR5* gene following botryosphaeran treatment, either alone or in combination with DXR, in tumor lymphocytes indicates a possible affinity of this particular (1→3)(1→6)-β-D-glucan for the receptor *CCR5*. Therefore, botryosphaeran action appears to be involved in the repression of genes related to the G₁ phase of the cell cycle and possibly in the interaction of the botryosphaeran, either alone, or in combination with DXR, with the *CCR5* receptor.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Exopolysaccharides (EPSs) are exocellular-secreted carbohydrate biopolymers produced during metabolic processes in microorganisms such as bacteria and fungi [1]. They are generally associated with protecting cells against the external environment and may act as carbon and energy reserves during periods of environmental stress [2].

According to Roupas et al. [3], *in vitro* and *in vivo* studies have described the benefits of the exopolysaccharides for health, including immunomodulatory, antitumor, antimicrobial

and hypocholesterolemic effects. The effectiveness of EPSs as immunomodulators, especially the group of β-D-glucans, allowed validation and approval of some of these molecules as adjuvants for the treatment of cancer in Japan, such as compound formulations of lenthionine (a cyclic organ sulfur compound) and the proteoglycan Krestin (PSK) [4].

The antitumor action of β-D-glucans is due to their ability to act as biological response modifiers (BRMs) [5], which involves binding of these molecules to specific host cell receptors, such as the complement receptor CR3, and dectin-1 [6,7]. This leads to the production of cytokines and, consequently, stimulation of the immune system through their effects on natural killer (NK) cells, macrophages and T lymphocytes [6].

Recently, Zong et al. [8] proposed that the antitumor action of β-D-glucans may occur through prevention of the development of cancer due to consumption of these bioactive molecules in the diet; through direct anticancer action, such as the induction of

* Corresponding author at: Departamento de Biologia Geral – CCB, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR (445), Km 380, CEP 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4417; fax: +55 43 3371 4207.

E-mail addresses: ilcecolus@gmail.com, colus@uel.br (I.M.d.S. Cólus).

apoptosis in tumor cells; through immunopotentiality of anti-tumor activity in combination with chemotherapy; and through inhibition of tumor metastasis. The number of studies addressing direct interventions involving the consumption of fungal polysaccharides in humans is small, and the existing research suggests few or no side-effects [3].

Botryosphaeran, an EPS ((1→3)(1→6)-β-D-glucan) secreted by the ascomycetes fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, is composed of a linear main chain of D-glucose residues bound by β-type glucosidic bonds (1→3), to which D-glucose (D-Glcp) and gentiobiose (β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp) residues are bound by (1→6)-β-glucosidic linkages [9].

Studies conducted by our research group have revealed a lack of mutagenicity and an antimutagenic effect of botryosphaeran in the peripheral blood and bone marrow cells of mice *in vivo*. This protective effect was dose dependent, and significant antimutagenic activity was detected, even at low doses of botryosphaeran [10]. Miranda-Nantes et al. [11] furthermore demonstrated that botryosphaeran exhibited hypoglycaemic and hypocholesterolaemic properties in rats with diabetes and hyperlipidaemia.

Given the biological effects described thus far for botryosphaeran and its potential therapeutic and biotechnological applications, *in vitro* assays using normal and tumor cells represent an important analytical tool for evaluating its selectivity as a therapeutic agent. Molecules showing selective activity for tumor cells decrease systemic toxicity and exert a more effective action [12].

Gene expression analyses associated with the versatility of flow cytometry assays, which provide multiple and simultaneous targets to assess cell death and cell kinetics in selected cell populations, were employed in this study. Thus, the present study investigated the effect of treatment with botryosphaeran, either alone or in combination with the chemotherapeutic agent doxorubicin (DXR) on normal and tumor lymphocytes to evaluate its effects on the modulation of the expression of genes associated with the recognition of β-D-glucan, immunomodulation, apoptosis and cell cycle regulation. In addition, the effect of this treatment on cell cycle kinetics was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and cultivation

B. rhodina (MAMB-05 isolate) was grown by submerged fermentation on sucrose as sole carbon source for 72 h at 28 °C under agitation conditions (180 rpm) as described by Steluti et al. [13].

2.2. Botryosphaeran production

Following fermentation, the fungal mycelium was removed, and the supernatant was recovered by centrifugation (1250 × g/15 min), and subsequently dialyzed for 48 h. The dialyzed solution was precipitated through the addition of three volumes of isopropanol and stored overnight at 4 °C. Then, the precipitate (EPS) was recovered by centrifugation, dissolved in distilled water and dialyzed with frequent changes of water over 48 h, and the EPS solution lyophilized and stored at –20 °C until used.

2.3. Preparation of botryosphaeran solutions

For use in treating of the cell lines under study, botryosphaeran was solubilized in sterile water to produce a stock solution of 3.0 g/L. A sample of this solution was utilized for the determination of reducing sugars by the cupro-arsenate method [14], and total sugars by the phenol-sulfuric method [15]. The concentration

of approximately 3.0 g/L was confirmed through these measurements, and this stock solution was then used throughout the experiments.

2.4. Cell culture

The biological effects of botryosphaeran were investigated in normal and leukaemic (Jurkat cells) lymphocyte cell cultures. The latter were kindly provided by the Blood Center of the Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo (Brazil), and were kept under liquid nitrogen until use.

Normal human lymphocytes were obtained through the collection of 10 mL volumes of peripheral blood from four healthy males, aged 18–35 years old, who were non-smokers and non-alcoholic, with no recent history of disease or exposure to radiation, pesticides or medications. All volunteers signed an informed consent form approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings of the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. The collected blood was diluted in PBS at 1:1 ratio (10 mL blood: 10 mL PBS), homogenized by inversion and subjected to the density gradient separation technique using *Ficoll Histopaque*® 1077 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) to obtain isolated lymphocytes.

2.5. Culture conditions

Normal and tumor lymphocytes were cultured in sterile 15 mL conical tubes (25 cm², Corning, Lowell, MA, USA) containing RPMI 1640 culture medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% foetal bovine serum (Gibco), 0.01 mg/mL streptomycin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.005 mg/mL penicillin (Sigma–Aldrich) and 2.38 mg/mL HEPES (Sigma–Aldrich). The conical tubes were kept at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂ at an inclination of approximately 45°, and were carefully inverted three times daily.

2.6. Experimental design

To evaluate the effect of botryosphaeran (30 μg/mL), either alone or in combination with the chemotherapeutic agent doxorubicin (DXR; 0.20 μg/mL) on the cell cycle kinetics of normal and tumor lymphocytes, approximately 2 × 10⁵ cells were seeded in sterile 15 mL conical tubes, incubated for a cell cycle (period of 24 h) in complete RPMI 1640 culture medium, and then subjected to one of the following treatments: (i) PBS for 24 h (negative control); (ii) DXR for 2 h (positive control); (iii) botryosphaeran for 24 h; (iv) combination of botryosphaeran + DXR for 2 h (simultaneous treatment); (v) botryosphaeran for 22 h, with washing of tubes, changing of the culture medium and the addition of DXR for 2 h (pre-treatment); (vi) DXR for 2 h with washing of tubes, changing of the culture medium and the addition of botryosphaeran for 22 h (post-treatment).

For gene expression assays, the same botryosphaeran concentration was maintained (30 μg/mL), but only the post-treatment protocol was evaluated.

All assays involving Jurkat cells comprised three independent experiments, each of which included an experimental triplicate.

2.7. Analysis of cell cycle kinetics by flow cytometry

Samples for analysis by flow cytometry were prepared using the *Cycle Test Plus DNA* kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Readings were obtained in a BD FACSCanto™ II Flow Cytometer (Becton,

Table 1
Genes analyzed through quantitative RT-qPCR, its respective categories and primers used for each one.

Category/Gene	Primer sequence*
Recognition of β glucan	
CCR5	F: 5' AGACCACCAACAGCCCTCA 3' R: 5' CACTTCCAACCCAAATCCAC 3'
CLEC7A	Invitrogen
ITGAM	Invitrogen
Cell cycle kinetics	
CDK4	F: 5' CTTCCTCTGTTGGCTTTCG 3' R: 5' GGGTCCACTGACTTCTCA 3'
C-MYC	F: 5' GGACTGTATGTGGAGCG 3' R: 5' TCGTTGAGAGGGTAGGG 3'
BCL-XL	F: 5' CAGCCGAGAGCCGAAAGG 3' R: 5' GAGGGTAGAGTGGATGGTC 3'
CDK2	Invitrogen
Apoptosis	
CASP3	F: 5' CATCCAGTCGCTTTGTGC 3' R: 5' ATTCTGTTGCCACCTTTCG 3'
BIRC5	F: 5' GACTGTGTGTGATGAGAG 3' R: 5' TAGAATGGCTTTGTGCTTAG 3'
Immunomodulation	
IL-2	F: 5' GTCAAAGCATCATCTCAACAC 3' R: 5' TAGCAAACCATACATCAACAA 3'
TNF- α	Invitrogen
Constitutive	
GAPDH	F: 5' GGGCATCCTGGGCTACTACT 3' R: 5' GTCCAGGGTCTTACTC 3'

* The primer sequences were designed using Gene Runner 3.05 software, with the exception of primers for the genes *CDK2*, *ITGAM*, *CLEC7A* and *TNF- α* , which were purchased from Invitrogen (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Dickinson (BD) Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, USA) calibrated to 10,000 events.

2.8. Quantitative real time PCR (RT-qPCR)

Gene expression analysis was performed through RT-qPCR analysis using SYBR Green methodology. The primers employed in this study were designed using Gene Runner 3.05 software, according to the mRNA sequences of the target genes obtained from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (Table 1). The following target genes were assessed: interleukin-2 (*IL-2*); chemokine receptor (*CCR5*); C-type lectin receptor (*CLEC7A*); dectin-1 receptor (*ITGAM*); tumor necrosis factor alpha (*TNF- α*); cyclin D1 (*CCND1*); cyclin-dependent kinases (*CDK2* and *CDK4*); caspase-3 (*CASP3*); *B2-cell lymphoma (BCL-XL)*; baculovirus inhibition of apoptosis protein repeat (*BIRC5*); and the retroviral oncogene v-myc (*C-MYC*). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) was used as housekeeping (Table 1).

Extraction of total RNA from normal and tumor lymphocyte cultures subjected to the botryosphaeran treatment, and the post-treatment protocol was carried out with a PureLink RNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The total extracted RNA was quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA); the degree of purity was determined based upon the A_{260}/A_{280} ratio, and samples with ratios in the range of 1.8–2.0 were considered to be pure. The quality and integrity of the RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis (1.5%).

Reverse transcription was performed on 1 μ L total RNA (500 ng) using the Superscript III reverse transcriptase Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed in a Quantica Real-Time PCR Thermal Cycler System (Techne; Staffordshire, UK). PCR amplification of each sample was performed in a final volume of 20 μ L.

Each PCR reaction contained 5.0 μ L (100 ng/ μ L) of the diluted cDNA, 10.0 μ L of SYBR Green Master Mix (Invitrogen, Life Technologies, USA), and 0.25 μ L (10 pM) each of the forward and reverse

primers. Each reaction was run in triplicate. In general, cycle parameters were: an initial denaturation step at 95 $^{\circ}$ C for 5 min followed by 45 rounds of amplification of 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60 $^{\circ}$ C for 15 s and 72 $^{\circ}$ C for 30 s. Melting curve analysis was performed at the end of reaction by an increase of the temperature from 55 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C in steps of 0.5 $^{\circ}$ C every 5 s.

2.9. Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm standard deviation. All test means from Jurkat cells were obtained from three independent experiments. In turn, the means from tests with normal lymphocytes were obtained from four different individuals.

After checking for homogeneity of variance of the data obtained in the flow cytometry tests, analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's test ($\alpha=0.05$), using GraphPad Prism 5 software (<http://www.graphpad.com>). The gene expression data were analyzed by the relative quantification method of Pfaffl [16] employing as a reference the housekeeping gene *GAPDH*. Statistical analysis was performed using REST[®] software (<http://gene-quantification.de>).

3. Results

3.1. Analysis of cell cycle kinetics by flow cytometry

Fig's 1 and 2 show the results of the analysis of the cell cycle kinetics of Jurkat cells subjected to treatment with doxorubicin (DXR), botryosphaeran and the combination of DXR and botryosphaeran using three different protocols: pre-treatment, simultaneous treatment and post-treatment.

The Jurkat cells displayed three different cell populations: diploid, aneuploid and tetraploid (Fig. 1), unlike normal lymphocytes, which were 100% diploid (data not shown).

Jurkat cells subjected to treatment with botryosphaeran or DXR alone, and in the pre- and simultaneous treatment protocols, exhibited a predominance of the diploid population and a low proportion of tetraploid population (Fig. 1). However, in the post-treatment protocol, there was a significant decrease in the diploid population and an increase in the tetraploid population (Fig. 1). The G_0/G_1 and S cycle phases in the diploid population in the post-treatment protocol presented a significant decrease when compared with that observed in the negative control group (Fig. 2A), as well as a significant increase of the tetraploid population in which 100% of cells were in the G_0/G_1 phase (Fig. 2B). The analysis of other treatments (botryosphaeran, DXR, pre- and simultaneous treatment protocols) showed that the cell proportions in the three phases of the cell cycle were statistically similar to those found in the negative control group.

The results of the analysis of the cell cycle kinetics of normal human lymphocytes subjected to treatment with botryosphaeran, DXR, and botryosphaeran + DXR (pre-, simultaneous- and post-treatments) are presented in Fig. 3. The diploid lymphocytes in all of the assessed treatments maintained cell proportions statistically similar to the negative control group in the three phases of the cell cycle (G_0/G_1 , S and G_2/M). Comparing the diploid populations of normal and tumor cells in all of the treatments, the tumor cells presented higher frequencies of cells in the S phase compared to the normal cells, which, in turn, presented higher cell frequencies in the G_2/M phase than the tumor cells.

Fig. 4 shows the results of a test performed in Jurkat cells subjected to treatment with botryosphaeran and DXR, pre-incubated for 2, 4 and 6 h, to assess whether some sort of "complex" is generated through the interaction of these substances that could promote the formation of tetraploid cells. Analysis of the results

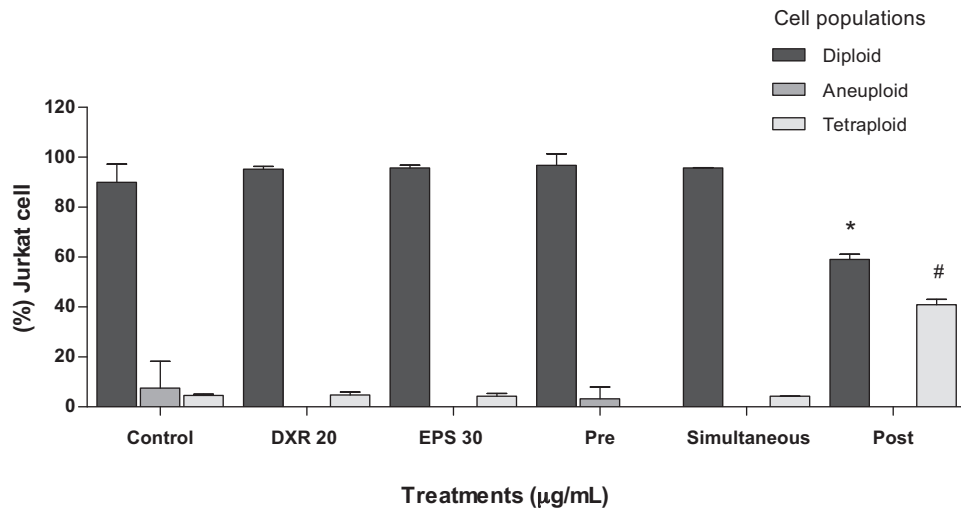
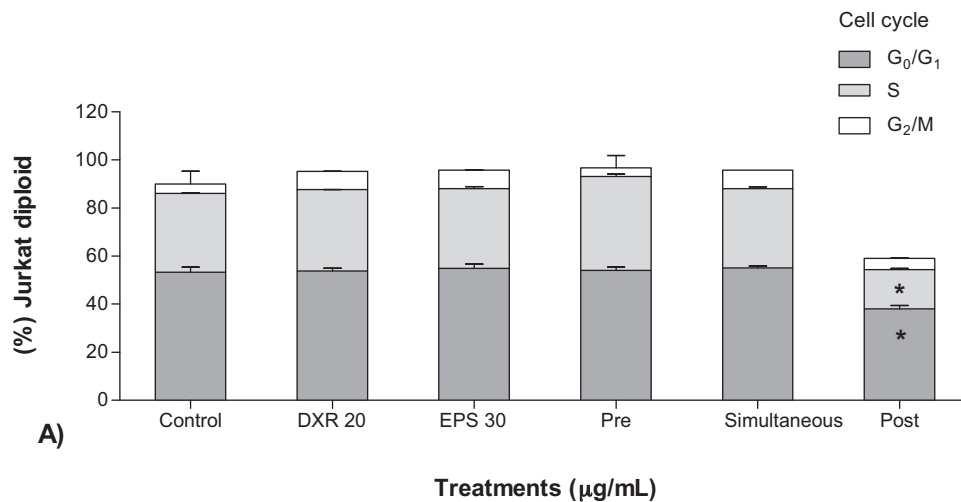
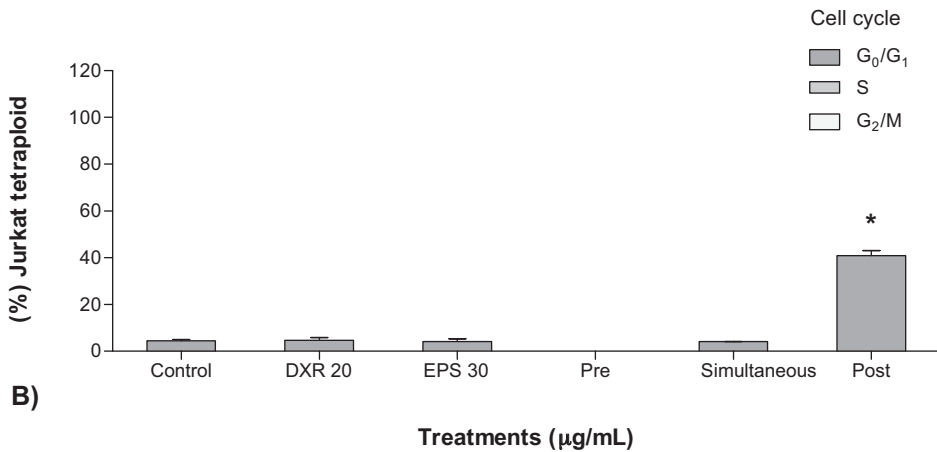


Fig. 1. Jurkat cell populations exposed to an EPS treatment protocol, either alone or combined with DXR. Control: PBS-24 h; DXR-2 h; EPS-24 h; pre: EPS-22 h followed by DXR-2 h; simultaneous: EPS + DXR-2 h; post: DXR-2 h followed by EPS-22 h. *Significantly different from the diploid population of the control group ($P < 0.05$); ANOVA followed by Tukey's test. #Significantly different from the tetraploid population of the control group ($P < 0.05$); ANOVA followed by Tukey's test.



A)

Treatments (µg/mL)



B)

Treatments (µg/mL)

Fig. 2. Cell cycle distribution of Jurkat cells treated with EPS, either alone or in combination with DXR. The results are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments. 2A: diploid population of Jurkat cells. 2B: tetraploid population of Jurkat cells.

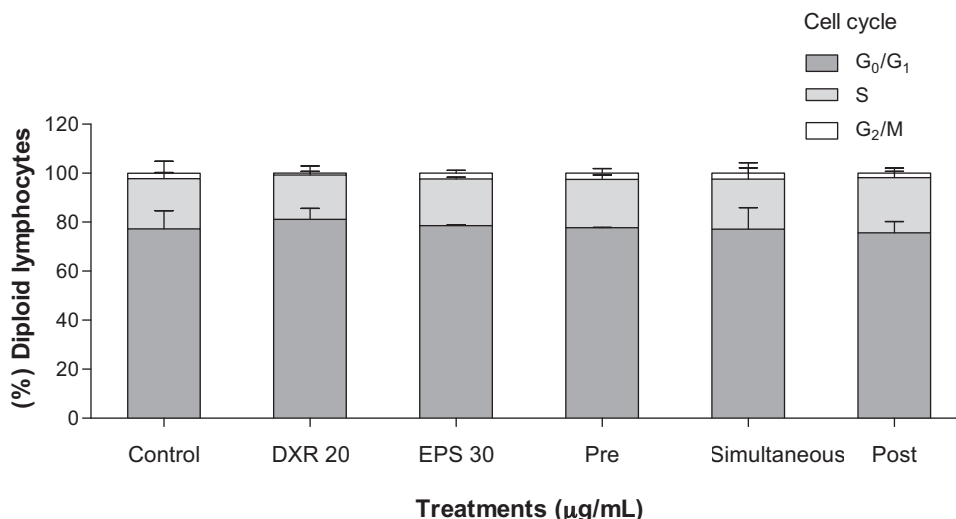


Fig. 3. Percentage of human diploid lymphocytes in each cell cycle phase determined via flow cytometry after 24 h of treatment with PBS (Control), doxorubicin (DXR) and doxorubicin in combination with botryosphaeran in the pre-treatment (EPS-22 h followed by DXR-2 h), simultaneous treatment (EPS + DXR-2 h) and post-treatment (DXR-2 h followed by EPS-22 h) protocols. The results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

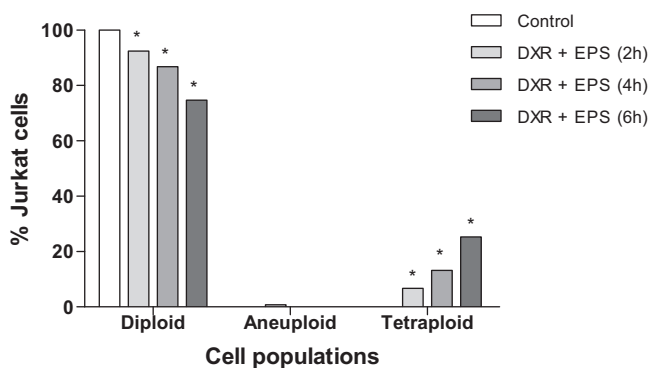


Fig. 4. Frequency of different populations of Jurkat cells evaluated via flow cytometry after 24 h of treatment with a pre-incubated EPS solution (30 μ g/mL) combined with DXR (20 μ g/mL) for 2, 4 or 6 h. Control: PBS treatment. *Significantly different from the control group (ANOVA followed by Tukey's test; $P < 0.05$).

revealed a decrease in the diploid population and simultaneously an increase in the tetraploid population. Both events were time-dependent.

3.2. Quantitative RT-qPCR

Results of the gene expression analyses in Jurkat cells are shown in Fig. 5. Analysis of *CCR5*, *CLEC7A* and *ITGAM* genes, involved in the recognition of β -D-glucans, showed a significant increase of *CCR5* transcripts in Jurkat cells treated with DXR. However, in the treatments with botryosphaeran alone or combined with DXR, the transcription profiles of these genes did not present significant changes.

Genes involved in checkpoint G₁, *CDK4*, *C-MYC* and *BCL-XL* showed significant transcriptional repression in Jurkat cells treated with botryosphaeran alone, or in association with DXR. The treatment with DXR alone was not able to alter these transcripts. Furthermore, the transcription of *CDK2* gene, involved in the progression of the S phase, was repressed only when the cells were treated with botryosphaeran.

The analysis of *CASP3* gene, involved in the apoptosis process, showed a significant increase in its transcripts in Jurkat cells treated with DXR. The treatment with botryosphaeran alone, or

in association with DXR, did not reveal significant changes in the transcription profile of this gene.

The three types of treatments of Jurkat cells (botryosphaeran, DXR and botryosphaeran + DXR) modulated differently the expression of genes associated with immunomodulation (*IL-2* and *TNF- α*). The *IL-2* gene presented a significant increase in the cells treated with DXR, but the transcriptional level of the *TNF- α* gene was not altered. Treatments with botryosphaeran alone, or associated with DXR, did not alter the transcription profiles of the *IL-2* gene, but showed significant transcriptional repression of the *TNF- α* gene.

The results of the analysis of the transcriptional profile of normal lymphocytes are shown in Fig. 6. Three treatments (botryosphaeran, DXR, botryosphaeran + DXR) decreased the expression of transcripts of the β -D-glucan cell receptor genes, *CLEC7A* and *ITGAM*. Treatment of the normal human lymphocytes with botryosphaeran, as well as botryosphaeran + DXR, resulted in down-regulation of the *CCR5* gene, but treatment with DXR resulted in an increase of the transcriptional level of this gene.

The transcripts of genes involved in checkpoint G₁ (*CDK4* and *BCL-XL*), in the S phase (*CDK2*), apoptosis (*CASP3* and *BIRC5*), and in immunomodulation (*TNF- α*), were not modulated by treatments of normal human lymphocytes with botryosphaeran, DXR, or botryosphaeran + DXR. The *C-MYC* gene involved in cellular proliferation and apoptosis, however, presented decreased expression in normal human lymphocytes treated with DXR.

The *IL-2* gene, related to immunomodulation, was significantly down-regulated in cells treated with botryosphaeran. In the other treatments (DXR; botryosphaeran + DXR), there were no significant changes in the expression of the transcripts of this gene.

4. Discussion

Various β -D-glucans isolated from fungi, including D-fraction (a bioactive β -D-glucan fraction), schizophyllan, polysaccharide-peptide (PSP) and polysaccharide K (PSK), which are effective anticancer agents, have been described, and their pharmacological effects demonstrated [8].

The exopolysaccharide botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan, from *B. rhodina* MAMB-5, was evaluated in this study in cultures of normal and tumor lymphocytes by means of flow cytometry and transcriptome (RT-qPCR) techniques.

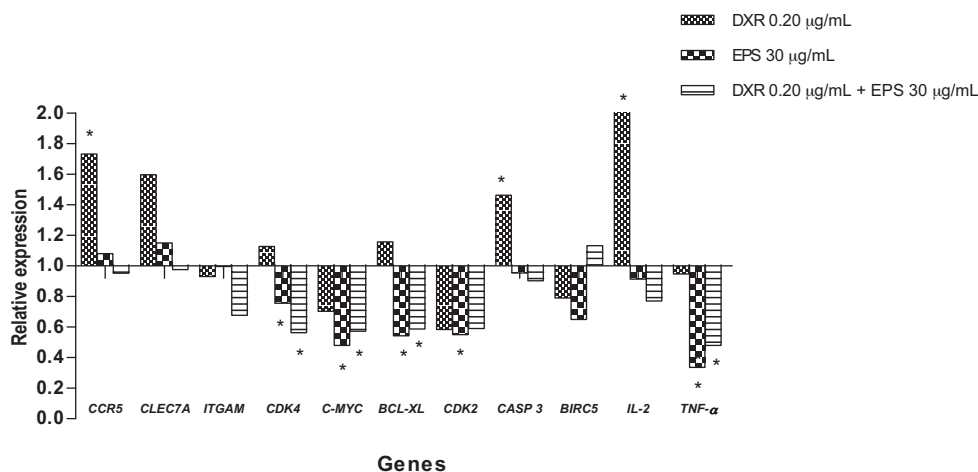


Fig. 5. Relative expression of the *CCR5*, *IL-2*, *CDK2*, *CDK4*, *C-MYC*, *CASP3*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TNF-α*, *CLEC7A* and *ITGAM* gene transcripts determined through RT-qPCR in Jurkat cells subjected to treatment with PBS (negative control); doxorubicin (DXR); botryosphaeran (EPS) and treatment with EPS followed by DXR. All data were normalized to the *GAPDH* gene. Comparisons were performed relative to the control group (PBS). *Significantly different from the control group ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's test).

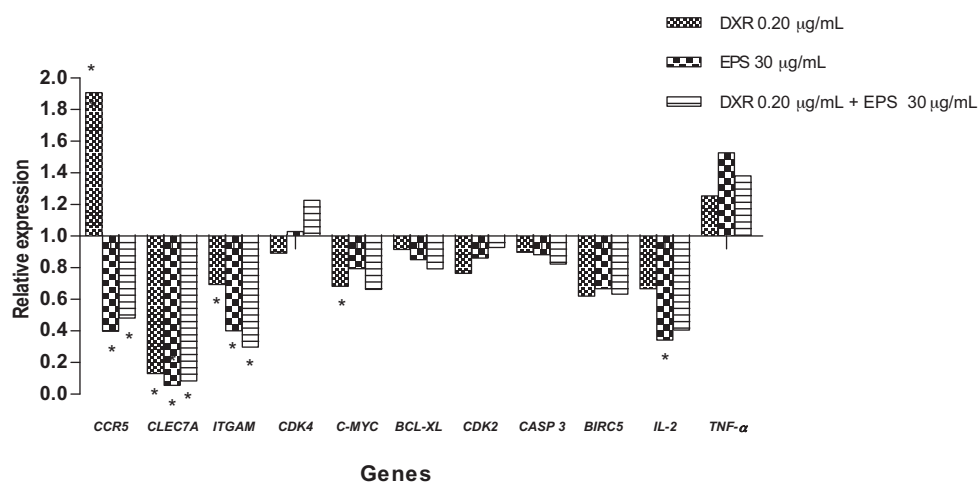


Fig. 6. Relative expression of the *CCR5*, *IL-2*, *CDK2*, *CDK4*, *C-MYC*, *CASP3*, *BCL-XL*, *BIRC5*, *TNF-α*, *CLEC7A* and *ITGAM* gene transcripts determined through RT-qPCR in cultures of normal human lymphocytes subjected to treatment with PBS (negative control); doxorubicin (DXR); botryosphaeran and treatment with EPS followed by DXR. All data were normalized to the *GAPDH* gene. Comparisons were performed relative to the control group (PBS). *Significantly different from the control group ($P < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's test).

Doxorubicin, an anthracycline antitumor agent, also induces cellular damage, and has the ability to act on topoisomerase II, and on tubulin and actin filaments by disrupting the cytoskeleton and promoting tetraploidy [17]. However, little induction of a tetraploid cell population was observed in Jurkat cells after treatment with DXR or botryosphaeran alone, in contrast to the high tetraploidy (41%) induced by combining botryosphaeran with DXR under post-treatment condition (botryosphaeran + DXR).

The results obtained in Jurkat cells by botryosphaeran (a (1→3)(1→6)-β-D-glucan) associated with DXR corresponds to a unique finding not reported before in the literature, and suggests that the interaction between these two compounds (possibly a complex formed through H-bonding), and may be responsible for the differential action of the drug on the cytoskeleton. To assess whether the interaction between DXR + botryosphaeran was responsible for the observed induction of tetraploidy, Jurkat cells were treated for 24h with a solution containing botryosphaeran and DXR, pre-incubated for three different times (2, 4 and 6 h) at 36 °C. In addition to the induction of tetraploidy, the results indicated that the increase in the tetraploid population observed after treatment with the pre-incubated solutions was time-dependent.

Thus, it can be inferred that the complex formed after interaction between botryosphaeran and DXR, has an effect on microtubules by disrupting the formation of, or destabilizing the already formed mitotic spindle, thus blocking cytokinesis. However, we cannot ignore the possibility suggested by Molinari et al. [17] that the interruption of cytokinesis also can occur through the disruption of actin filaments. Therefore, this hypothesis requires additional experiments for confirmation.

Compounds with antimetabolic properties cause disruption of the mitotic spindle and induce failure in cytokinesis, which activates the spindle assembly checkpoint (SAC), which is one of the mechanisms responsible for promoting cell arrest and prolonging mitosis [18]. In a study aimed at defining how tumor cells respond to antimetabolic agents, Gascoigne and Taylor [19] found that after several hours of treatment, most cells entered mitosis and remained in this phase for quite some time before undergoing one of the two possible fates, i.e., exiting mitosis and returning to interphase, or dying in mitosis.

In the present study, the Jurkat cells did not undergo mitotic arrest and instead migrated to the G_0/G_1 phase of interphase. In this phase, according to Gascoigne and Taylor [19], cells can potentially

experience three fates: death, remain in the interphase, or enter a second mitosis. Although rare, some cells may divide. According to Rieder and Maiato [18], both normal and tumor cells continuously exposed to antimetabolic agents are viable 4n cells when exiting the SAC and entering the G₁ phase of the cell cycle. The results of our study support this hypothesis because of the 46% of the cells that entered mitosis, approximately 5% remained in this phase, while the other 41% passed the SAC of M phase and continued to the G₁ phase as tetraploid cells, where they remained. The fact that Jurkat cells manage to pass the SAC and exit mitosis may indicate a possible resistance mechanism of these cells to the complex derived from the interaction of DXR with botryosphaeran.

Our results corroborate the findings of Jordan et al. [20] in HeLa cells (human uterine cervix carcinoma) and of Tao et al. [21] in the human cell lines A2780 (ovarian carcinoma), HTC116 (colorectal carcinoma) and HT29 (colon adenocarcinoma) [20,21], who provided an explanation for this phenomenon, as an adaptation or escape of the mitotic checkpoint, where prolonged exposure of tumor cells to taxol induced the exit of these cells from mitosis without cell division, followed by remaining permanently in a tetraploid state. Although Gascoigne and Taylor [19] and Brito and Rieder [22] discussed the participation of cyclin B1 in this process, the mechanism responsible for the escape of the SAC and, consequently, of the M phase, still remains to be clarified.

Some studies have shown that apoptosis induced by certain antimetabolic drugs such as nocadazole and taxol requires activation of the SAC and subsequent escape from mitotic arrest by the tumor cells [21,23]. According to Vogel et al. [24], tetraploid cells that exit mitosis aberrantly trigger a response depending on the TP53 gene in the G₁ phase to prevent further polyploidization. Jordan et al. [20] stated that cells that override the mitotic spindle checkpoint and exit M phase showing tetraploid characteristics had a tendency to undergo apoptosis in G₁.

Despite these reports, it is not possible to conclude whether the subsequent activation of the checkpoint in G₁ is related to the onset of apoptosis [25]. The data obtained in our study through flow cytometry analyses indicated that 100% of the tetraploid cells observed in the post-treatment protocol were in the G₀/G₁ phase. However, evaluation of the cell cycle via flow cytometry, in both Jurkat cells and normal T lymphocytes, did not show the presence of cells in the sub-G₀ phase, which is characteristic of cells undergoing cell death.

The transcriptomic expression analysis of the CASP3 gene also did not confirm the induction of apoptosis in the assessed Jurkat cells, except when treated with doxorubicin alone, where it was possible to detect an increase in the transcripts of this gene. In this case, induction was expected because cell death by apoptosis is an important mechanism of action for chemotherapeutic drugs [26]. CASP3 activation is required for IL-2 production in activated Jurkat cells [27]. Our data support this conclusion because increased transcriptional levels of the IL-2 gene were found only in Jurkat cells treated with DXR alone.

The repression of TNF- α gene transcripts in Jurkat cells treated with botryosphaeran alone, or in combination with DXR, confirmed the absence of cells undergoing cell death (sub-G₀ phase) as indicated by flow cytometry. The increase in TNF- α expression was associated with an increase in signaling for apoptosis because this transcript encodes a pro-inflammatory cytokine mediator of the apoptotic process [28].

The absence of apoptosis observed in this study does not appear to be related to the phenomenon of resistance to cell death cited by Rebutti and Michiels [29], where overexpression of anti-apoptotic proteins and inactivation of pro-apoptotic genes would occur. In contrast, it was found that Jurkat cells treated with botryosphaeran either alone, or in combination with DXR, showed a decrease in the transcripts of the anti-apoptotic genes BCL-XL and C-MYC.

The BIRC5 gene is usually expressed in tumor tissues and is overexpressed after chemotherapy in most tumors, playing a key role in resistance to anticancer drugs [30]. The findings of our study showed no change in the transcription of this gene under any of the treatment conditions assessed for the Jurkat cells, which also weakens the possible resistance mechanism of these cells to treatments performed with botryosphaeran combined with doxorubicin.

Gene expression analysis showed that when Jurkat cells were treated with botryosphaeran alone, this could be related to proliferative induction, as indicated by the observed down-regulation of the transcripts of the genes CDK4, C-MYC and BCL-XL, all of which are responsible for controlling cell proliferation and acting in the checkpoint of G₁ phase of the cell cycle. Under combined treatment with botryosphaeran and DXR, the genes BCL-XL and CDK4 were also down-regulated, with the latter being even more repressed than in the treatment with botryosphaeran alone.

This antiproliferative effect in G₁, which was more pronounced under the combined treatment of Jurkat cells, can be associated with cell cycle arrest in the G₁ phase observed during flow cytometry analysis. These results further reinforce the notion that the combination of a β -D-glucan such as botryosphaeran with doxorubicin triggers a different and intense response of the antitumor effect exerted by this chemotherapeutic drug alone. The significant repression of CDK2 gene transcription observed under treatment of Jurkat cells with botryosphaeran alone was not sufficient to interrupt the cell cycle in S phase, as the flow cytometry data indicated that there was no significant increase in cells in this cell cycle phase.

In general, the transcriptional profiles of the β -D-glucan receptors ITGAM and CLECKA indicated low expression in all treatments performed in normal lymphocytes and showed no change in the transcription of these genes under any of the treatment conditions assessed for the Jurkat cells. These results suggest that the recognition of botryosphaeran is possibly being performed by another receptor.

The increase in the CCR5 gene transcript observed in normal and tumor lymphocytes treated with DXR alone, and the repression of this transcript in treatments using botryosphaeran alone, or in combination with DXR, in normal lymphocytes, may indicate a possible molecular mechanism of botryosphaeran action. It is likely that this (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan shows binding affinity for the CCR5 receptor, and promotes its inhibition. According to Weitzenfeld and Ben-Baruch [31], the high expression of the CCR5 gene is associated with the promotion of malignancy and tumor growth.

5. Conclusions

The antiproliferative effects of botryosphaeran in combination with the antineoplastic agent doxorubicin were selective for leukemic T lymphocyte cells. The molecular mechanisms of action of this (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan appear to be involved in the repression of genes related to the G₁ phase of the cell cycle. In addition, they indicate a possible path for further studies investigating the relationship between botryosphaeran, either alone or in combination with DXR, and the CCR5 receptor. Specific changes in the dynamics of the mitotic spindle microtubules promoted by the combination of botryosphaeran with DXR deserves further investigation to clarify such aneugenic activity, as well as its possible antitumor specificity. These results, together with those previously reported by our research group, indicate botryosphaeran as a strong candidate for use in adjuvant cancer therapy when combined with doxorubicin in a post-treatment protocol.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazil; Processo N^o. 478839/2012-0; I.M.S. Cólus). The *Natural Science and Engineering Research Council* (NSERC) of Canada is acknowledged for a Research Capacity Development grant awarded by Lakehead University to R.F.H. Dekker. *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil) is thanked for a doctorate scholarship to M. Malini, and CNPq for the PQ (Research Productivity) scholarship awarded to I.M.S. Cólus and L.M.G. Antunes. We thank the volunteers who donated blood, and the technical support of Ms. Rossana Batista de Oliveira Godoy Camargo, Mr. Jefferson Codognotto, Dr. Regislaine Valéria Burim, Ms. Fabiana da Silva Lima and Mr. Dário Tormena.

References

- [1] S. Ye, F. Liu, J. Wang, H. Wang, M. Zhang, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 764–770.
- [2] A. Mishra, K. Kavita, B. Jha, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 852–857.
- [3] P. Roupas, J. Keogh, M. Noakes, C. Margetts, P. Taylor, *J. Funct. Foods* 4 (2012) 687–709.
- [4] Y. Munemoto, Y. Iida, J. Abe, H. Saito, K. Fujisawa, Y. Kasahara, T. Mitsui, Y. Asada, S. Miura, *Int. J. Oncol.* 20 (2002) 403–411.
- [5] J.A. Bohn, J.N. BeMiller, *Carbohydr. Polym.* 28 (1995) 3–14.
- [6] K.S. Kim, H.S. Yun, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 496–500.
- [7] B.-Z. Zaidman, M. Yassin, J. Mahajna, S. Wasser, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 453–468.
- [8] A. Zong, H. Cao, F. Wang, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1395–1410.
- [9] A.M. Barbosa, R.M. Steluti, R.F.H. Dekker, M.S. Cardoso, M.L. Corradi da Silva, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1691–1698.
- [10] C.C.B.O. Miranda, R.F.H. Dekker, J.M. Serpeloni, E.A.I. Fonseca, I.M.S. Cólus, A.M. Barbosa, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 172–177.
- [11] C.C.B.O. Miranda-Nantes, E.A.I. Fonseca, C.T.B.V. Zaia, R.F.H. Dekker, N. Khaper, I.A. Castro, A.M. Barbosa, *Mycobiology* 39 (2011) 187–193.
- [12] M.J. Akhtar, M. Ahamed, H.A. Alhadlaq, S.A. Alrokayan, S. Kumar, *Clin. Chim. Acta* 436 (2014) 78–92.
- [13] R.M. Steluti, E.C. Giese, M.M. Piggato, A.F.G. Sumiya, L.G. Covizzi, A.E. Job, M.S. Cardoso, M. De Lourdes Corradi Da Silva, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa, *J. Basic Microbiol.* 44 (2004) 480–486.
- [14] M. Somogyi, *J. Biol. Chem.* 160 (1945) 61–68.
- [15] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [16] M.W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001).
- [17] A. Molinari, A. Calcabrini, P. Crateri, G. Arancia, *Exp. Mol. Pathol.* 53 (1990) 11–33.
- [18] C.L. Rieder, H. Maiato, *Dev. Cell* 7 (2004) 637–651.
- [19] K.E. Gascoigne, S.S. Taylor, *Cancer Cell* 14 (2008) 111–122.
- [20] M.A. Jordan, K. Wendell, S. Gardiner, W. Brent Derry, H. Copp, L. Wilson, *Cancer Res.* 56 (1996) 816–825.
- [21] W. Tao, V.J. South, Y. Zhang, J.P. Davide, L. Farrell, N.E. Kohl, L. Sepp-Lorenzino, R.B. Lobell, *Cancer Cell* 8 (2005) 49–59.
- [22] D.A. Brito, C.L. Rieder, *Curr. Biol.* 16 (2006) 1194–1200.
- [23] T. Kasai, Y. Iwanaga, H. Iha, K.-T. Jeang, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5187–5193.
- [24] C. Vogel, A. Kienitz, I. Hofmann, R. Muller, H. Bastians, *Oncogene* 23 (2004) 6845–6853.
- [25] M. Schmidt, H. Bastians, *Drug Resist. Updates* 10 (2007) 162–181.
- [26] L. Ren, C. Perera, Y. Hemar, *Food Funct.* 3 (2012) 1118–1130.
- [27] R. Posmantur, K.K.W. Wang, R.B. Gilbertsen, *Exp. Cell Res.* 244 (1998) 302–309.
- [28] N. Kassouf, M.H. Thornhill, *Oral Oncol.* 44 (2008) 672–682.
- [29] M. Rebucci, C. Michiels, *Biochem. Pharmacol.* 85 (2013) 1219–1226.
- [30] J. Liu, Y. Wang, J.I. Jiang, R. Kong, Y.-M. Yang, H.-F. Ji, Y.-Z. Shi, *Chinese Med. J.* 123 (2010) 2901–2907.
- [31] P. Weitzenfeld, A. Ben-Baruch, *Cancer Lett.* 352 (2014) 36–53.