



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIVANIO BARANOSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE β -GLUCANAS SULFATADAS
E NÃO SULFATADAS EXTRAÍDAS DE *Agaricus brasiliensis*
EM ENSAIOS DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA E A
INTERFERÊNCIA NOS DANOS INDUZIDOS POR
DOXORRUBICINA EM CÉLULAS MCF-7 E ERITRÓCITOS**

Londrina
2014

ADRIVANIO BARANOSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE β -GLUCANAS SULFATADAS
E NÃO SULFATADAS EXTRAÍDAS DE *Agaricus brasiliensis*
EM ENSAIOS DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA E A
INTERFERÊNCIA NOS DANOS INDUZIDOS POR
DOXORRUBICINA EM CÉLULAS MCF-7 E ERITRÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B225a Baranoski, Adrivanio.

Avaliação dos efeitos de β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas extraídas de *Agaricus brasiliensis* em ensaios de genética toxicológica e a interferência nos dados induzidos por doxorubicina em células MCF-7 e eritrócitos / Adrivanio Baranoski. – Londrina, 2014.
82 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Teses. 2. Células – Metabolismo – Teses. 3. Células – Proliferação – Teses. 4. Toxicologia genética – Teses. 5. Polissacarídeos – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.385.5

ADRIVANIO BARANOSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE β -GLUCANAS SULFATADAS E NÃO
SULFATADAS EXTRAÍDAS DE *Agaricus brasiliensis* EM ENSAIOS DE
GENÉTICA TOXICOLÓGICA E A INTERFERÊNCIA NOS DANOS
INDUZIDOS POR DOXORRUBICINA EM CÉLULAS MCF-7 E
ERITRÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Zaira da Rosa Guterres
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul –
UEMS

Londrina, 25 de fevereiro de 2014

BARANOSKI, Adivanio. **Avaliação dos efeitos de β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas extraídas de *Agaricus brasiliensis* em ensaios de genética toxicológica e a interferência nos danos induzidos por doxorubicina em células MCF-7 e eritrócitos.** Trabalho de Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR 2014.

RESUMO

As β -glucanas (β -G), polissacarídeos produzidos por vários organismos diferentes, apresentam propriedades benéficas, como potencial antioxidante, estímulo do sistema imune e proteção do material genético. No presente estudo, β -G sulfatadas e não-sulfatadas extraídas de *Agaricus brasiliensis* apresentaram no Ensaio do MTT, que avalia um parâmetro de metabolismo, citotoxicidade dose-dependente sendo a sulfatada mais citotóxica, e quando associado à doxorubicina (DXR), β -G sulfatadas potencializaram a ação do quimioterápico. No Ensaio do Vermelho Neutro, que avalia o potencial de incorporar e armazenar esse corante nos lisossomos por células viáveis, apenas em 24 horas, os tratamentos de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -G sulfatada apresentaram redução significativa de incorporação, nos demais tempos e concentração não houve diferença, assim como não houve diferença para β -G não-sulfatadas com relação ao controle. Também não apresentaram ação hemolítica ou mutagênica e nem proteção contra danos causados pela DXR nos ensaios de hemólise e cometa, respectivamente. Não houve alteração significativa da proliferação celular em 96 horas para o tratamento com β -G não-sulfatada, e apenas a concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -G sulfatada após 72 horas apresentou redução significativa de proliferação no ensaio do RTCA. O estudo da expressão demonstrou que ambas β -G, principalmente a sulfatada, não causam danos no DNA como observado no ensaio do genotoxicidade. As β -G não causam estresse às células e na concentração e tempo estudados, não interferem na expressão dos genes de ciclo celular avaliados. Os resultados sugerem que ambas formas de β -G interferem no metabolismo e não causam morte celular, e que β -G sulfatadas possuem maior toxicidade.

Palavras chave: Metabolismo. Genotoxicidade. Proliferação celular.

BARANOSKI, Adrivanio. **Evaluation of the effects of β -glucans sulfated and non-sulfated extracted from *Agaricus brasiliensis* in genetic toxicology assays in the injury induced interference for doxorubicin in MCF-7 cells and erythrocytes.** Work Master's Dissertation – Postgraduate degree in Program in Genetics and Molecular Biology, Department of General Biology, Center for Biological Sciences - State University of Londrina. Londrina-PR 2014.

ABSTRACT

The β -glucan (β -G), polysaccharides produced by many different organisms, have beneficial properties, such as antioxidant activity, stimulation of the immune system, and protection of the genetic material. In the present study, β -G sulfated and non-sulfated extracted from *Agaricus brasiliensis* presented in the MTT assay, that evaluates a parameter of metabolism, dose-dependent cytotoxicity being the most cytotoxic sulfated, and when combined with doxorubicin (DXR), sulfated β -G potentiated the action of chemotherapy. In Test of Neutral Red, that assesses the potential to incorporate and store this dye in the lysosomes by viable cells, only at 24 hours, the treatments of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of sulfated β -G showed a significant reduction of incorporation, so there was no difference in β -G non-sulfated compared to control. Also showed no hemolytic or mutagenic action nor protection against damage caused by DXR in hemolysis and comet assays, respectively. There was no significant change in cell proliferation at 96 hours for treatment with β -G not-sulfated, and only at concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ sulfated β -G after 72 hours showed a significant reduction in proliferation assay RTCA. The study showed that expression of both β -G, mainly sulfated, not cause DNA damage as observed in genotoxicity testing. The β -G not cause stress to the cells and studied the concentration and time, do not interfere with the expression of cell cycle genes evaluated. The results suggest that both forms of β -G interfere with the metabolism and do not cause cell death, and sulfated β -G have greater toxicity.

Keywords: Metabolism. Genotoxicity. Cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura-1** – β -glucanas são constituintes da parede celular de bactérias e fungo 11
- Figura-2** – β -glucanas (1-3) sulfatada com ramificação (1-6)..... 16

ARTIGO

- Figura-1** – MTT - Tratamentos com β -glucanas por 24, 48 e 72 horas 31
- Figura-2** – MTT - Tratamentos com β -glucanas associadas a DXR por 24 horas 32
- Figura-3** – Vermelho Neutro - Tratamentos com β -glucanas por 24, 48 e 72 horas..... 33
- Figura-4** – Hemólise - Tratamentos com β -glucanas por 24 horas 34
- Figura-5** – Ensaio do Cometa - Tratamentos com β -glucanas por 3 horas 36
- Figura-6** – RTCA - Tratamentos com β -glucanas sulfatada durante 96 horas..... 37
- Figura-7** – RTCA - Tratamentos com β -glucanas não-sulfatada durante 96 horas..... 38
- Figura-8** – RTCA - Índice celular normalizado nos pontos de 24, 48 e 72 horas..... 39
- Figura-9** – Valores de expressão dos genes *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CCND1*, *P53*,
CHECK1 e *CHECK2*..... 40
- Figura-10** – Valores de expressão dos genes *GADD45A*, *GADD153*, *XPA*, *PCNA3*,
ERCC5 e *NFE2L2* 41
- Figura-11** – Valores de expressão dos genes *BAX*, *BAK*, *BCL-2*, *BCL-XL* e *CASP-9*..... 42
- Figura-12** – Valores de expressão dos genes *MAP2K6*, *ABL1*, *ABL2* e *GAPDH*..... 43

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO GERAL	8
1	<i>AGARICUS BRASILIENSIS</i> E β -GLUCANAS	8
2	CARACTERÍSTICAS E ATIVIDADES DE β -GLUCANAS	11
3	β -GLUCANAS E RESPOSTAS BIOLÓGICAS	12
4	ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DE β -GLUCANAS	13
5	RECEPTORES DE β -GLUCANAS	15
6	EFEITOS PREJUDICIAIS DE β -GLUCANAS	15
7	β -GLUCANAS SULFATADAS	16
II.	OBJETIVOS	18
1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
III.	ARTIGO	19
1	INTRODUÇÃO	21
2	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1	LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTURA E ERITRÓCITOS	23
2.2	AGENTES QUÍMICOS E INDUTORES DE DANOS	23
2.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MTT	24
2.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - VERMELHO NEUTRO	24
2.5	ENSAIO DE HEMÓLISE	25
2.6	ENSAIO DO COMETA	25
2.7	CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL (RTCA)	26
2.8	EXPRESSÃO GÊNICA	27
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3	RESULTADOS	30
3.1	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)	30
3.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (VERMELHO NEUTRO)	32
3.3	ENSAIO DE HEMÓLISE	34
3.4	ENSAIO DO COMETA	34
3.5	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL (RTCA)	36
3.6	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	39

4	DISCUSSÃO	43
4.1	AGRADECIMENTOS	51
5	REFERÊNCIAS	51
IV.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICES	64
	ANEXOS	81

I. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente existe grande preocupação com agentes prejudiciais à saúde, tais como os cancerígenos, e estudos na área de Genética Toxicológica têm sido realizados para avaliar os efeitos de diferentes agentes. Alguns compostos que ocorrem naturalmente podem apresentar efeitos maléficos ou benéficos ao material genético, sendo importante a identificação destes.

Por volta dos anos 60, pesquisadores foram atraídos para a região do município de Piedade, no Estado de São Paulo (Brasil) onde a população de agricultores imigrantes japoneses apresentavam longevidade elevada e baixas taxas de problemas de saúde. Os pesquisadores observaram que estas pessoas tinham como hábito alimentar o consumo de um cogumelo que é nativo desta região, o *Agaricus brasiliensis* (Murrill) ss. Wasser (Wasser et al., 2002) (= *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann), conhecido comercialmente como “cogumelo-do-sol”. Consumido há centenas de anos, além de ter um valor nutritivo considerável, tem apresentado propriedades medicinais no tratamento de diversos males (FELIPPE, 1999).

1 *AGARICUS BRASILIENSIS* E β -GLUCANAS

Oliveira e colaboradores (2002) estudaram os efeitos genotóxicos e/ou antígenotóxicos de extrato aquoso de *A. blazei* Murrill em células de mamíferos através dos ensaios de Micronúcleo (MN) e Cometa. Os autores utilizaram extrato aquoso a uma concentração de 2,5% em três diferentes temperaturas (60, 25 e 4 °C), e com o extrato em diferentes associações - simultâneo, pré-tratamento, pós-tratamento e simultâneo após a pré-incubação de 1 h com metilmetanosulfonato (MMS), o qual também foi utilizado como controle positivo. O extrato se mostrou sem atividade genotóxica, não foi encontrado efeito protetor no teste do cometa, e o extrato nas três diferentes temperaturas avaliadas mostraram efeito protetor no ensaio do micronúcleo. Os autores sugerem que a propriedade ativa do *A. blazei* está sempre no extrato, sugerindo que este tem ação antimutagênica, provavelmente do tipo desmutagênica (capaz de inativar o agente mutagênico). Rodrigues e colaboradores (2003) observaram aumento de sobrevivência e diminuição da frequência de mutação espontânea em *Aspergillus nidulans* da linhagem *biA1methG1*, os quais foram tratados por 12 horas com 2,5% do extrato aquoso do cogumelo, demonstrando o efeito antimutagênico de extrato do *A. blazei*. Bellini e colaboradores (2003) demonstraram acentuado efeito anticlastogênico de

extratos de *A. blazei* extraídos em diferentes temperaturas, onde células CHO-K1 foram tratadas com 0,15% de extrato e associadas a 0,0004 Mol de MMS por 12 horas.

Em estudo realizado por Guterres e colaboradores (2005), com extratos de *A. blazei*, obtidos de diferentes fontes comerciais ou estirpes. Os autores utilizaram 1,5 gramas de pó de cogumelo misturados a 40 mL de água destilada a 100 °C, seguido de 10 minutos de agitação, adicionado 40 mL de clorofórmio: metanol (3:1) a agitado por 4 horas, e filtrado. Após a evaporação, 3 mg de resíduo de extrato foram diluídos em 400 µL de dimetil sulfóxido e 4600 µL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), e utilizaram como concentração final 60 µL/mL desta solução em células de pulmão de hamster chinês (V79). Não foi observado efeitos genotóxicos ou mutagênicos do extrato, no entanto houve proteção do material genético contra a indução de micronúcleos por MMS. Bellini e colaboradores (2006) mostraram que diferentes extratos (metanólico, hexânico, n-butanólico e aquoso) de *A. blazei* apresentam efeitos anticlastogênicos e antigenotóxicos causando diminuição da frequência de micronúcleos em células HTC e CHO-k1, sugerindo que as diferentes formas de extratos continham as substâncias protetoras. Estes trabalhos indicam que o uso deste fungo como chás ou na alimentação apresentam potenciais benéficos com relação a saúde de quem os utiliza.

Padilha e colaboradores (2009) estudaram os efeitos de extratos aquosos e alcalinos de *A. blazei* Murill sobre os processos inflamatórios produzidos por diferentes agentes em ratos. A administração oral de extratos inibiu marginalmente o edema induzido por nistatina, porém, ambos os extratos foram capazes de inibir significativamente a formação de edema induzido por 5% de adjuvante completo de Freund (potencial para danos nos tecidos). Três dias após a administração do estímulo, houve uma inibição de até 26% (extrato aquoso) e 93% (extrato alcalino), após 9 dias, a inibição foi de 43% no grupo tratado com o extrato aquoso e 39% com o grupo tratado com o extrato alcalino. Este trabalho demonstrou que os extratos de *A. blazei* podem ser úteis no combate a doenças inflamatórias devido a ativação do sistema imune.

O extrato aquoso de *A. brasiliensis* preparado em duas diferentes temperaturas, 4 °C e 25 °C (7,5 g de extrato em 100 mL de água esterilizada) foi testado quanto a inibição de quebras na cadeia de DNA e aberrações cromossômicas (AC) em linfócitos humanos tratados com a doxorrubicina (DXR). Os resultados demonstraram que o extrato foi capaz de reduzir o dano no DNA induzido por DXR em ambas as temperaturas. Quando este extrato foi estudado pelo ensaio de AC, houve redução maior dos danos quando as células foram tratadas com o

extrato obtido a 25 °C, demonstrando que este extrato apresenta efeitos antígenotóxicos e anticlastogênicos em linfócitos humanos (GAMEIRO et al., 2013).

Soares e colaboradores (2013) investigaram o extrato aquoso de *A. blazei* no pré-tratamento de lesões causadas por paracetamol em ratos em indicadores clássicos de danos em tecidos como os níveis das enzimas hepáticas no plasma e também em indicadores de parâmetros metabólicos e funcionais. Para os indicadores clássicos para danos nos tecidos, o extrato forneceu um grau razoável de proteção contra a lesão do paracetamol tanto em tecidos hepático quanto cerebral. Também evitou o aumento dos níveis das enzimas hepáticas (indicadoras de danos) tais como Aspartato Transaminase, Alanina Transaminase, Lactato Desidrogenase, e Fosfatase Alcalina, e normalizou os níveis de Ácido Tiobarbitúrico em ambos tecidos. Em relação aos parâmetros metabólicos e funcionais, o extrato forneceu pouca proteção.

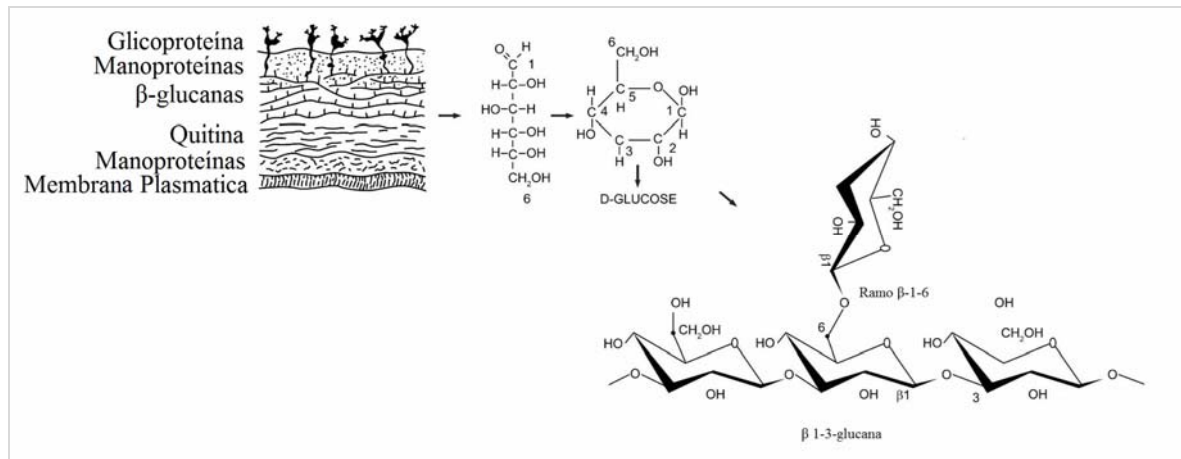
Estes resultados seriam devido principalmente pela presença de polissacarídeos tais como β -glucanas. Em resumo, vários autores indicam que β -glucanas de diversas origens apresentam efeitos antimutagênicos, antioxidantes (CHEN & SEVIOUR, 2007), anticlastogênico (OLIVEIRA et al., 2009) e imunomoduladores (YAMADA et al., 2007), os quais reprimem os efeitos genotóxicos ou a atividade de mutágenos ou carcinógenos. Além disso, outras propriedades das β -glucanas foram descritas, tais como proteção contra infecções bacterianas (STUYVEN et al., 2009), ativação do sistema imune, estimulando a atividade antitumoral e modificadoras da resposta celular (AKRAMIENE et al., 2007), entre outros, demonstrando a importância deste agente para a prevenção ou tratamento de diversas doenças.

2 CARACTERÍSTICAS E ATIVIDADES DE β -GLUCANAS

As β -glucanas são polissacarídeos que ocorrem naturalmente (**Fig.-1**), sendo um polímero de glicose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow3)$ com ramificações que podem ser do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ ou $\beta(1\rightarrow6)$, e são encontrados em uma variedade de organismos tais como a aveia, cevada e algas marinhas, também são constituintes da parede celular de algumas bactérias patogênicas e fungos como *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* (AKRAMIENE et al., 2007). A estrutura macromolecular depende da fonte e métodos de isolamento (ZEKOVIĆ et al., 2005). Cogumelos apresentam maiores quantidades de $\beta(1\rightarrow4)$

(1→6) que $\beta(1\rightarrow3)$ (1→4) e diferentes ligações simples como $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow6)$ (MULLINS, 1990).

Figura -1 – β -glucanas é constituintes da parede celular de bactérias e fungo, entre outros (esquerda). A subunidade base de β -glucanas de fungos é β -d-glicose ligada uma a outra por cadeia glicosídicas (1→3), com ramos glicosídicas (1→6) (direita). O comprimento e numero de ramos das β -glucanas de diversos tipos de fungos são amplamente diferentes. (Adaptado de Chan e colaboradores 2009).



Muitos autores têm estudado as β -glucanas com relação à estimulação do sistema imune, exercendo efeitos positivos sobre várias infecções de origens bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias (MAGNANI & GÓMEZ, 2008), ativação de linfócitos T citotóxicos, *natural killer*, células fagocíticas (HONG et al., 2004) e efeitos estimulantes na produção de monócitos e neutrófilos (SONCK et al., 2010). As β -glucanas foram responsáveis pelo aumento da transcrição de genes do sistema imune em células do baço de bacalhau (CAIPANG et al., 2012), e as diferenças estruturais das β -glucanas, tais como o comprimento da cadeia polissacarídica, quantidade e o comprimento de ramificações, podem ter implicações para a ativação do sistema imune (CHEN & SEVIOUR, 2007).

As β -glucanas foram eficazes na prevenção de danos clastogênicos. Oliveira e colaboradores (2009) avaliaram dois conjuntos de camundongos, sendo um conjunto de fêmeas grávidas e outro de não grávidas. Os autores verificaram que β -glucanas extraídas de *S. cerevisiae* foram eficazes na prevenção de danos clastogênicos nos dois conjuntos, e observaram uma tendência para uma redução no nível de malformações, aumento na viabilidade fetal e assim o desempenho reprodutivo em fêmeas.

3 β -GLUCANAS E RESPOSTAS BIOLÓGICAS

As β -glucanas apresentam respostas benéficas quando administrada só, ou como adjuvante à terapias. Miadoková e colaboradores (2005) em seus experimentos demonstraram que β -glucanas isoladas de *S. cerevisiae* desempenham papel importante na carcinogênese e mutagênese por possuir atividade antioxidante bem como efeitos expressivos antimutagênicos e bioprotetores, exercidos através da aplicação combinada com outros compostos biologicamente ativos (mutagênico/carcinogênico). Şener e colaboradores (2006) sugerem que as β -glucanas isoladas de *S. cerevisiae*, através de seus efeitos antioxidantes e atividade na resposta imune, pode ser considerada como um potencial agente terapêutico por aliviar os efeitos secundários do metotrexato (agente utilizado no tratamento de doenças reumáticas e tumores malignos), tais como diarreia e outros, sem comprometimento de sua atividade antitumoral. Os autores demonstraram ainda que uma vez eliminados os efeitos secundários do metotrexato, pode-se conduzir a uma melhor tolerância à droga e uma terapia mais eficiente e confortável seria alcançada para pacientes com necessidade deste tratamento.

Akramiene e colaboradores (2010) utilizaram β -glucanas de levedura na terapia fotodinâmica, a qual combina uma droga ou fotossensibilizador com um tipo específico de luz para matar células neoplásicas. Os pesquisadores obtiveram redução significativa do crescimento do tumor, aumento de necrose nos tecidos tumorais e supressão do sistema de reparo de danos ao DNA nestas células. Além disso, as β -glucanas com estruturas diferentes apresentaram efeitos semelhantes como potenciadores nesta terapia.

As β -glucanas também demonstraram atividades anticarcinogênicas, prevenindo a oncogênese e a metástase, além de efeitos positivos na proteção contra infecções (CHEN & SEVIOUR, 2007). Em animais, a administração oral de β -glucanas de fungo têm demonstrado efeito antitumoral, e em pacientes com câncer colorretal e câncer gástrico, demonstrou a diminuição da atividade destes problemas e o aumento da sobrevida quando usado como adjuvante à cirurgia e quimioterapia padrão (SAKAMOTO et al., 2006).

Em estudos *in vivo*, β -glucanas de *S. cerevisiae* demonstraram proteção significativa contra infecção ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica) em leitões desmamados (STUYVEN et al., 2009). Recentemente, verificou-se o efeito destas β -glucanas sobre a incidência de resfriados comuns e seu efeito sobre os sintomas de gripes comuns. Como resultado, obteve-se redução significativa dos sintomas típicos tais como dor de garganta e/ou dificuldade de engolir, rouquidão e/ou tosse e coriza, demonstrando que β -glucanas tem efeito

profilático sobre a ocorrência de resfriados comuns e sobre os sintomas de gripes comuns, além de reduzir o número de casos com relação ao controle (GRAUBAUM et al., 2012).

As β -glucanas de aveia produzem quantidades mais elevadas de butirato do que outras fibras, assim, a ingestão destas podem reduzir significativamente os lipídios séricos em uma população de alto risco e melhorar a saúde (QUEENAN et al., 2007). Wolever e colaboradores (2011) verificaram em seu trabalho a influência de β -glucanas de aveia também com relação aos níveis de colesterol LDL em diferentes etnias. Os autores concluíram que β -glucanas de aveia reduzem o colesterol LDL tanto em caucasianos quanto em não caucasianos, porém não puderam determinar se a magnitude da redução deste colesterol diferiu nestas etnias. Bilal e colaboradores (2012) demonstraram que a redução de concentrações séricas de colesterol LDL total ocorre sem afetar os níveis de colesterol HDL e triglicerídeos. Portanto, β -glucanas podem diminuir o risco de doença aterosclerótica vascular, e sua eficácia na administração oral indica que β -glucanas são capazes de passar através da parede do trato gastrointestinal, sendo um aspecto positivo, uma vez que seria uma via de mais fácil administração.

As β -glucanas também se mostraram benéficas como suplemento na alimentação de peixes fazendo com que a eficiência alimentar melhorasse e os mesmos tiveram um ganho de peso considerável comparados a um grupo controle (WELKER et al., 2012). Portanto, β -glucanas podem ser designada como um modificador de respostas biológicas por desencadear uma série de eventos na resposta imune quando é reconhecida pelo organismo.

4 ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DE β -GLUCANAS

As β -glucanas tem demonstrado muitos efeitos benéficos e entre estes, alguns pesquisadores demonstraram efeitos antimutagênicos.

Chorvatovičová e colaboradores (1996) avaliaram a administração de Carboximetilglucana (CMG) (molécula solúvel derivado de β -glucana) isolada de *Aspergillus niger* sobre os efeitos de ciclofosfamida na frequência de micronúcleos em medula óssea de camundongos. Os autores administraram CMG por via intraperitoneal, intravenosa ou oralmente, antes da injeção de ciclofosfamida. Foi observado que na administração intravenosa e intraperitoneal houve redução do número de micronúcleos dependente da concentração, enquanto o tratamento oral com CMG diminuiu significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea.

Slameňová e colaboradores (2003) evidenciaram que carboximetil-quitina-glucana isolada de *A. niger* foi eficaz na prevenção de danos no DNA causados por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células pulmonares de camundongo através do Ensaio do Cometa. Os autores sugeriram que a redução da atividade genotóxica ocorreu por β-glucanas terem reagido com os radicais hidroxila (OH⁻) liberados na biotransformação do peróxido de hidrogênio.

In vitro, Oliveira e colaboradores (2006) examinaram o mecanismo de ação da β-glucanas de cevada em relação à antimutagenicidade utilizando o Ensaio de Micronúcleo em duas linhagens de células (CHO-K1 e HTC). Foi utilizado três concentrações de β-glucanas (5, 10, e 20 µg/mL), as quais foram combinadas com um agente mutagênico (metilmetanosulfonato-MMS ou 2-aminoantraceno), usando quatro protocolos de tratamento diferentes: pré-tratamento, simultâneo (simples e com pré-incubação), e pós-tratamento. Seus resultados mostraram atividade quimiopreventiva na linhagem celular CHO-K1 tratada com MMS, e atividade quimiopreventiva para a dose mais elevada no pré e pós-tratamento na linhagem celular HTC. Todas as doses foram eficazes no tratamento simples simultâneo. Em células HTC tratadas com a mais baixa concentração em pré e pós-tratamento não houve eficácia na prevenção de danos ao DNA, sugerindo que β-glucanas atuam tanto no composto mutagênico (desmutagênico) quanto no sistema de reparos de DNA (bio-antimutagênico).

Dentre as pesquisas que investigam a atividade antimutagênica de β-glucanas, algumas delas indicam que β-glucanas de *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* Murrill ss. *Heinemann*) tem apresentado esta propriedade. Angeli e colaboradores (2009a) realizaram um estudo para investigar o efeito quimiopreventivo de β-glucanas extraídas de *A. blazei* contra danos no DNA induzidos por benzo[a]pireno utilizando os ensaios do Cometa (genotoxicidade) e Micronúcleo (mutagenicidade) em linhagem celular de hepatoma humano (HepG2). Os autores, visando identificar qual mecanismo protetivo as β-glucanas utilizam, (ação desmutagênica ou ação bio-antimutagênica), demonstraram em que as β-glucanas não exercem efeitos genotóxicos ou mutagênicos, e não protegem contra danos no DNA causados pelo benzo[a]pireno, no entanto seus dados de pré-tratamento sugeriram que estas moléculas atuem se ligando ao benzo[a]pireno ou capturando radicais livres produzidos durante a ativação deste.

Um segundo estudo realizado por Angeli e colaboradores (2009b) visando verificar os efeitos de β-glucanas de *A. blazei*, extraído em diferentes fases de maturidade (estágio imaturo, maduro, com esporos imaturos e estágio maduro com esporos maduros) utilizando o Ensaio do Cometa na linhagem celular HepG2, contra H₂O₂, bleomicina e doxorrubicina.

Seus resultados demonstraram que β -glucanas protegem contra danos no DNA causados pelos três indutores utilizados, sendo que os maiores efeitos protetores foram observados com β -glucanas extraídas das fases mais maduras.

5 RECEPTORES DE β -GLUCANAS

Provavelmente, as β -glucanas de fungos atuam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e são reconhecidas por receptores de superfície celulares apropriados como os receptores de reconhecimento de padrão (PRR) (CHEN & SEVIOUR, 2007). A indução e respostas celulares por β -glucanas de cogumelos e outros organismos envolve sua interação específica com um ou mais receptores de superfície. Vários receptores estão relacionados ao reconhecimento desta, entre estes estão o dectin-1, Receptor do Sistema Complemento 3 (CR3), lactosilceramida (LacCer), receptor do tipo *toll-like* (TLR) e receptor *scavenger*, dentre estes o receptor com papel melhor esclarecido é o dectin-1 (CHEN & SEVIOUR, 2007; TSONI & BROWN, 2008).

Muitas das propriedades de β -glucanas podem ser explicadas pela sua interação com dectin-1, principalmente em leucócitos, alguns dos efeitos são mediados através de outros receptores, especialmente em células não imunes. O dectin-1 reconhece β -glucanas solúveis e particuladas, incluindo partículas fúngicas intactas e também possui um ligante para linfócitos T (STEELE et al., 2003). A expressão de dectin-1 predomina em tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, linhagens de neutrófilos e células dendríticas. Dectin-1 tem a tarefa de vigilância contra patógenos (TSONI & BROWN, 2008).

6 EFEITOS PREJUDICIAIS DE β -GLUCANAS

Apesar das β -glucanas serem consideradas seguras, e diversos artigos científicos as apresentarem como tendo potenciais benéficos, existe alguns efeitos negativos associados a estes polissacarídeos.

O uso intravenoso de β -glucanas podem induzir a formação de granulomas e se administrado em combinação com agentes anti-inflamatórios não-esteroidais, as β -glucanas solúveis podem induzir efeitos colaterais, incluindo aumento da lesão gastrointestinal e peritonite (WILLIAMS et al., 1996).

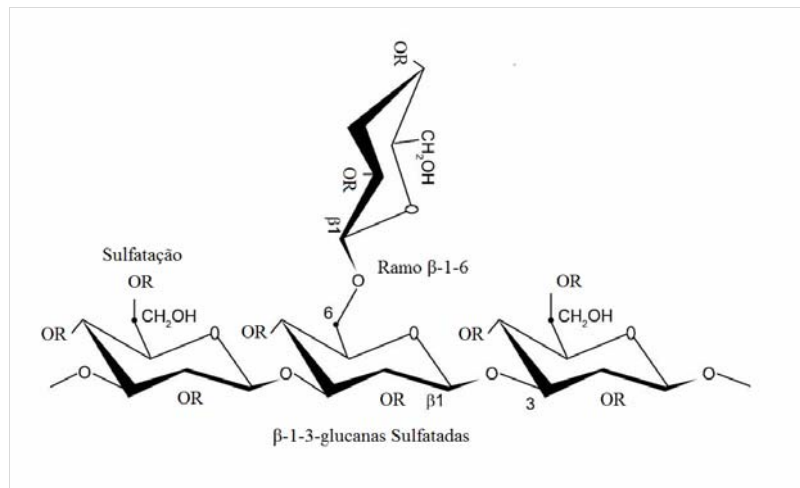
Holck e colaboradores (2007) utilizando voluntários saudáveis e voluntários com problemas alérgicos (respiratórios), observaram que apenas na exposição à β -glucanas, não

houve a liberação de histamina (que causa a broncoconstrição), porém na presença de anti-imunoglobulina E (IgE), todas as glucanas investigadas conduziram a um aumento da liberação de histamina sugerindo que β -glucanas mediada por IgE agrava os efeitos alérgicos. Em adição, β -glucanas têm sido implicadas no desencadeamento de doenças auto-imunes e poderiam estar envolvida no desenvolvimento de desordens respiratórias, incluindo alergia e asma (TSONI & BROWN, 2008).

7 β - GLUCANAS SULFATADAS

Sabe-se que β -glucanas apresentam muitas propriedades biológicas benéficas à saúde, porém um grande obstáculo para a utilização clínica é sua relativa falta de solubilidade em meio aquoso (HAN et al., 2008). Houve esforços na indústria química para modificação de β -glucanas, e a sulfatação desta molécula vem recebendo uma atenção contínua desde que os grupos sulfato demonstraram ter um papel importante em diversas atividades biológicas. A sulfatação (**Fig.-2**) torna a molécula consideravelmente mais solúvel. Sabe-se que polissacarídeos sulfatados têm diversas funções fisiológicas, tais como anticoagulante, antitumoral, entre outras (CHANG et al., 2006).

Figura -2 – β -glucanas 1-3 sulfatada com ramificação 1-6. OR indica onde geralmente ocorre a sulfatação em β -glucanas. A sulfatação torna as β -glucanas mais solúveis (Figura adaptada de Chan e colaboradores 2009).



Existem trabalhos sobre β -glucanas modificadas, porém ainda há poucos sobre β -glucanas sulfatadas e pouco se conhece sobre os efeitos e os mecanismos de ação desta (CHORVATOVIČOVÁ et al., 1998; SLAMEŇOVÁ et al., 2003). E existe a indicação que a

sulfatação de polissacarídeos pode mudar consideravelmente suas atividades biológicas em plantas para aumentar a sua defesa e resistência, abrindo novas rotas para o desenvolvimento de novo compostos (MÉNARD et al., 2004).

Kim e colaboradores (2012) obtiveram β -glucanas solúveis a partir de β -glucanas extraídas de *Ganoderma lucidum* (insolúvel) pelo método de sulfatação. Ao avaliarem a toxicidade de β -glucanas sulfatadas, estas não apresentaram efeitos negativos sobre o peso corporal ou sobre o consumo de alimentos por ratos, quando administrado doses de 20, 200 e 2000 mg/Kg durante 7 dias. Não foi detectado patologias clínicas, funcionais, comportamentais ou brutas indicando toxicidade. Porém foi observado aumento estatisticamente significativa de glóbulos brancos e de neutrófilos em machos e aumento de volume corpuscular médio nas fêmeas. Estes resultados também demonstraram que β -glucanas sulfatadas quimicamente não foram considerados altamente tóxicos após exposição peritoneal para até 2.000 mg/Kg dia em ratos.

As β -1 \rightarrow 3-glucanas sulfatadas foram caracterizadas como um potente inibidor do vírus da dengue com muita eficiência em diferentes tipos celulares. Concentração mínima eficaz de β -1 \rightarrow 3-glucanas sulfatadas era tão baixa quanto 0,1 μ g/mL em células LLC -MK2, e apresentou toxicidade apenas em concentrações superiores a 10 mg/mL. A adição de composto não só inibiu a infecção viral no passo de ligação às células hospedeiras, mas também a um passo de pós-fixação de entrada, a fusão da membrana. As β -1 \rightarrow 3-glucanas sulfatadas agem interferindo com os passos de ligação e fusão da membrana viral, os primeiros e críticos eventos de replicação do vírus na infecção (ICHIYAMA et al., 2013). Esses trabalhos indicam que existe potencial importante a ser investigado com relação as β -glucanas sulfatadas.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos verificar os efeitos das β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas extraídas de *A. brasiliensis* quanto à citotoxicidade em células MCF-7 e eritrócitos, genotoxicidade, cinética de proliferação e expressão gênica em células MFC-7 a fim de compreender os mecanismos de ação destas moléculas.

1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar, no ensaio de citotoxicidade (MTT), a interferência de ambas formas de β -glucanas na viabilidade celular nas concentrações de 5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em células MCF-7 em 24, 48 e 72 horas. E as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ associadas a doxorrubicina 1 μM para investigar proteção em 24 horas de tratamento.

-Avaliar, no ensaio de citotoxicidade Vermelho Neutro, a interferência de ambas formas de β -glucanas na viabilidade celular nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em células MCF-7, e a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ associadas a doxorrubicina 0,5 μM para investigar proteção em 24, 48 e 72 horas.

-Investigar a presença de ação hemolítica de ambas formas de β -glucanas nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas de tratamento em eritrócitos através do Ensaio de Hemólise.

-Avaliar através do Ensaio do Cometa, os efeitos de ambas formas de β -glucanas nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em células MCF-7, e a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ associadas a doxorrubicina 1 μM por 3 horas de tratamento, em relação a genotoxicidade e/ou antigenotoxicidade pelo tratamento associado em células MCF-7.

-Analisar a cinética de proliferação celular de ambas formas de β -glucanas nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em células MCF-7, e a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ associadas a doxorrubicina 0,5 μM durante 96 horas de tratamento, utilizando o Ensaio de Cinética de Proliferação Celular em Tempo Real através do aparelho *RTCA xCELLigence*.

-Avaliar a expressão dos genes relacionados a apoptose, ciclo celular, metabolismo, estresse oxidativo e sistemas de reparos em células MCF-7, quando tratadas por ambas formas de β -glucanas na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 6 horas.

III. ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista *Toxicology in Vitro*

Avaliação dos efeitos de β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas extraídas de *Agaricus brasiliensis* em ensaios de genética toxicológica e a interferência nos danos induzidos por doxorubicina em células MCF-7 e eritrócitos

Baranoski, A.¹; Oliveira, M. T.¹; Mantovani, M. S.¹

A. Baranoski
Departamento de Biologia Geral – CCB
Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário
Londrina, Paraná, Brasil
CEP: 86051-990
e-mail: adrivaniobaranoski@yahoo.com.br

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

As β -glucanas (β -G), polissacarídeos produzidos por vários organismos diferentes. No presente estudo, β -G sulfatada e não-sulfatada extraídas de *Agaricus brasiliensis* apresentaram no Ensaio do MTT, que avalia um parâmetro de metabolismo, citotoxicidade dose-dependente sendo a sulfatada mais citotóxica, e quando associado a doxorrubicina (DXR), β -G sulfatadas potencializaram a ação do quimioterápico. No Ensaio do Vermelho Neutro, que avalia o potencial de incorporar e armazenar o corante nos lisossomos por células viáveis, apenas em 24 horas, os tratamentos de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -G sulfatada apresentaram redução significativa de incorporação do vermelho neutro, nos demais tempos e concentração não houve diferença, assim como não houve diferença para β -G não sulfatada. Também não apresentaram ação hemolítica, genotóxica ou antígenotóxica nas condições estudadas nos ensaios de Hemólise e Cometa respectivamente. Apenas após 72 horas de para o tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -G sulfatada, houve redução significativa de proliferação celular. O estudo da expressão sugere que ambas β -G, principalmente sulfatada não causam danos no DNA assim como observado no ensaio do genotoxicidade. As β -G não causam estresse oxidativo e na concentração e tempo estudados, não interferem na expressão de genes do ciclo celular avaliados. Os resultados sugerem que ambas formas de β -G interferem no metabolismo e não causam morte celular.

Palavras chave: Metabolismo. Genotoxicidade. Proliferação celular.

1. INTRODUÇÃO

Muitas patologias, tais como o câncer de mama, podem ser evitadas pelo controle de exposição a agentes potencialmente prejudiciais à saúde. O consumo na dieta de agentes que melhoram os mecanismos de defesa como ativadores do sistema imune, agentes antioxidantes, anticancerígenos e a não exposição a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, tem colaborado para este contexto. O *Agaricus brasiliensis*, um cogumelo nativo do Brasil tem apresentado propriedades importantes, sendo utilizado na medicina popular principalmente como chá. Estudos de seus extratos revelam propriedades tais como proteção contra danos ao DNA, ativação do sistema imune, entre outros (GUTERRES et al., 2005; BELLINI et al., 2006; PADILHA et al., 2009; GAMEIRO et al., 2013) as quais são atribuídas principalmente pela presença de polissacarídeos tais como β -glucanas.

As β -glucanas são polissacarídeos que ocorrem naturalmente como constituintes da parede celular de algumas bactérias e fungos e são produzidos por uma variedade de organismos tais como a aveia, cevada e algas marinhas. Têm atraído a atenção de pesquisadores por estimular o sistema imune, humoral e celular, apresentando efeitos positivos sobre várias infecções de origens bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias (MAGNANI & GÓMEZ, 2008), ativação de células T citotóxicas, *natural killer*, fagocíticas (HONG et al., 2004) e efeitos estimulantes na produção de monócitos e neutrófilos (SONCK et al., 2010). Além disso, demonstrou efeito protetor contra os danos causados pelo benzo[a]pireno (SILVA et al., 2013).

Com o propósito de aumentar a sua solubilidade, algumas modificações bioquímicas foram realizadas em β -glucanas. Entre essas modificações, a sulfatação recebeu atenção devido às atividades biológicas que promovem os grupos sulfato, principalmente porque faz com que a molécula se torne mais solúvel. As β -glucanas dos microrganismos *Poria cocos* e *Pleurotus tuber-regium*, quando sulfatados, demonstraram efeitos antitumoral e antiviral, e β -glucanas sulfatadas extraídas do cogumelo *Parmotrema mantiqueirense* apresentam efeitos antitrombóticos e anticoagulante demonstrando novos potenciais. Estas atividades podem ser explicadas pela maior solubilidade de β -glucanas sulfatadas, devido a sua maior incorporação e aumento de pequenos fragmentos de β -glucanas, o que resulta em vantagens farmacêuticas e alimentares (CHANG et al., 2006; MANTOVANI et al., 2008). A potência das atividades biológicas de β -glucanas insolúveis ou solúveis em água ainda é controversa. Recentemente foi observado que β -glucanas em partículas (insolúveis), quando administrados oralmente,

têm atividades imunoestimulante mais potentes do que os β -glucanas solúveis (BATBAYAR et al., 2012).

Muito se conhece sobre os efeitos benéficos das β -glucanas de diferentes fontes e de algumas β -glucanas modificadas (CHORVATOVIČOVÁ et al., 1998; SLAMENŇOVÁ et al., 2003; MANTOVANI et al., 2008; BATBAYAR et al., 2012). Porém seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados e menos se conhece sobre β -glucanas sulfatadas. Além disso, estudos sugerem que β -glucanas sulfatadas apresentam efeitos diferentes em relação a β -glucanas não sulfatadas (MÉNARD et al., 2004).

As β -glucanas demonstraram atividade anticarcinogênica, prevenindo a oncogênese e a metástase (CHEN & SEVIOUR, 2007). O câncer de mama é uma das neoplasias mais frequentes entre as mulheres e é o segundo mais frequente no mundo. Em 2012, 1,7 milhão de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama e sua incidência tem aumentado sendo a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres (522 000 mortes em 2012) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Se diagnosticado e tratado em tempo tem prognóstico relativamente bom. Por isso, é importante a busca de novos agentes e o desenvolvimento de novas terapias mais eficientes e, se possível, com menos efeitos colaterais aos pacientes.

Quando utilizado como adjuvante, β -glucanas de diferentes fontes tem demonstrado vários efeitos benéficos. Aliviam os efeitos secundários do tratamento de doenças reumáticas e tumores malignos sem comprometer a atividade do agente antitumoral. Uma vez eliminados estes efeitos secundários, pode-se conduzir uma terapia mais eficiente e confortável para os pacientes (AKRAMIENE et al., 2010).

As β -glucanas tem demonstrado participação na modulação gênica. Silva e colaboradores (2013) avaliaram o efeito protetor de β -glucanas sobre a expressão dos genes *ERCC5* que é envolvido na reparação de danos ao DNA, *CASP-9* envolvido em apoptose, e *CYP1A1* que está envolvido no metabolismo de xenobióticos em células HepG2 quando expostas ao benzo[a]pireno (B[a]P). Quando as células eram tratadas com 50 μ g/ml de β -glucanas, havia redução significativa na expressão do gene *ERCC5*, sem alteração nos níveis de transcrição de *CASP-9*, demonstrando uma ação protetora destas moléculas. A expressão do gene *CYP1A1* foi induzida por B[a]P só ou em associação com β -glucanas, enquanto as células expostas a apenas β -glucanas não mostraram modulação do *CYP1A1*, porém houve tendência na redução da expressão deste gene, novamente demonstrando uma possível ação protetora.

Devido aos muitos efeitos benéficos das β -glucanas e os poucos entendimentos dos mecanismos moleculares envolvidos no modo de ação desses compostos, modelos experimentais com linhagem tumoral podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação dessas moléculas. Neste trabalho verificamos as ações citotóxicas e/ou citoprotetoras, cinética de proliferação celular, genotoxicidade e/ou antigenotoxicidade correlacionando a expressão de genes relacionados a apoptose, ciclo celular, metabolismo, estresse oxidativo, e sistemas de reparos em células de adenocarcinoma mamário tratadas com β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas extraídas de *A. brasiliensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTURA E ERITRÓCITOS

A linha de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram cultivadas como uma monocamada em frascos para cultura de 25 cm² com 10 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco), e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem é de aproximadamente 24 horas. Para todos os ensaios biológicos somente foi utilizado suspensão celular com viabilidade superior a 80% avaliado pelo método de exclusão de azul de Tripán em contador de células automático *CountessTM Invitrogen*. Para Ensaio de Hemólise foi utilizado sangue tipo A+, retirado no mesmo dia em indivíduo jovem, saudável e não fumante.

2.2 AGENTES QUÍMICOS E INDUTORES DE DANOS

Neste trabalho foi utilizado β -glucanas extraídas de *A. brasiliensis*. As β -glucanas foram extraídas e sulfatadas pela Prof. Dra. Sandra de Aguiar Soares da Universidade Federal do Ceará e fornecida juntamente com β -glucanas não sulfatadas. Como agentes indutores de danos no DNA e controles positivos, foram utilizados a doxorrubicina (DXR) e o Triton X100. Foi utilizado doxorrubicina nas concentrações de 1 μ M nos ensaios do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)- (MTT - CAS 298931; Sigma Aldrich®) e cometa. E concentração de 0,5 μ M de doxorrubicina para os ensaios de Vermelho Neutro (Vermelho Neutro - CAS 553-24-2; Sigma Aldrich®) e Cinética de Proliferação Celular em

Tempo Real (RTCA). Foi utilizado lise de eritrócitos por Triton X100 2 µL/mL (Triton® X100 - CAS 9002-93-1; Sigma Aldrich®) como controle positivo no Ensaio de Hemólise.

2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MTT

O Ensaio de Citotoxicidade - MTT foi baseado no protocolo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde cada poço com exceção do branco, recebeu 100 µL de meio de cultura contendo $6,25 \times 10^3$ células. Foi aguardado 24 horas para estabilização e adicionado mais 100 µL de cada tratamento, finalizando 200 µL com as diferentes concentrações de ambas formas de β-glucanas. Foi aguardado o tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas) e no final destes períodos, as células foram incubadas em meio de cultura celular sem soro com MTT diluído (0,0005 µg/mL) por 4 horas. O sobrenadante foi retirado, os cristais formados foram diluídos em 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e realizado a leitura em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 540 nm. O percentual de Viabilidade Celular foi obtido através do seguinte cálculo: $((\text{Absorbância Média de Tratamento} \times 100) / \text{Absorbância Média de Controle}) = \text{Percentual de Viabilidade Celular}$. Para este ensaio, foi utilizado como controle positivo, doxorrubicina 1 µM (controle DXR), e como controle foi utilizado meio sem tratamento. Sete concentrações de ambas formas de β-glucanas foram testadas sendo 5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Também foi realizado o mesmo ensaio utilizando as concentrações de 50 e 100 µg/mL de ambas formas de β-glucanas associadas à doxorrubicina 1 µM por 24 horas de tratamento. Foram realizados três experimentos contendo triplicatas por cada experimento.

2.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE - VERMELHO NEUTRO

O Ensaio de Citotoxicidade – Vermelho Neutro foi realizado de acordo com Vaucher e colaboradores (2010). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde cada poço com exceção do branco, receberam 100 µL de meio de cultura contendo 3125 células. Após 24 horas de incubação, foram adicionados 100 µL de cada tratamento finalizando 200 µL com as diferentes concentrações das duas formas de β-glucanas (5, 50 e 100 µg/mL). A concentração mais alta (100 µg/mL) foi associado a doxorrubicina 0,5 µM. Como controle positivo, foi utilizado doxorrubicina 0,5 µM (controle DXR), e como controle as células foram cultivadas com meio sem tratamento. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, as células foram incubadas

em meio de cultura sem soro com Vermelho Neutro diluído (30 µg/mL) por 3 horas. Após esse período, foi retirado o sobrenadante e as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de PBS por poço. As células foram diluídas em solução contendo 49% de água, 1% de ácido acético glacial e 50% de álcool etílico absoluto, agitados por 5 minutos, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 540 nm. O percentual de Viabilidade Celular foi obtido através do seguinte cálculo: $((\text{Absorbância Média de Tratamento} \times 100) / \text{Absorbância Média de Controle}) = \text{Percentual de Viabilidade Celular}$. Foram realizados três experimentos contendo triplicatas por cada experimento.

2.5 ENSAIO DE HEMÓLISE

O Ensaio de Hemólise foi realizado de acordo com Alves e colaboradores (2012) com modificações. Foi utilizado sangue tipo A+ coletado no mesmo dia de indivíduo jovem e não fumante. O sangue foi centrifugado por 15 minutos a 1440 RPM, o sobrenadante foi retirado, foi preparada uma solução de 2% de hemácias, 78% de PBS e 20% de meio para cada tratamento. As diferentes concentrações de ambas formas de β-glucanas, sendo 25, 50 e 100 µg/mL foram previamente diluído nos 20% do meio. Foram utilizadas placas de 96 poços sendo adicionado 300 µL de solução por poço. Como controle positivo, foi realizado a lise das hemácias com Triton X100 (2 µl/mL) e agitadas em vortex. Após o período de 24 horas de tratamento, as hemácias precipitaram ao fundo do poço, 100 µL do sobrenadante foi retirado e levado à outra placa para leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 414 nm. Foram realizados três experimentos contendo triplicatas por cada experimento.

2.6 ENSAIO DO COMETA

No ensaio do cometa (SINGH et al., 1988), foi utilizado um controle (células sem tratamento), e controle positivo, um indutor de danos no DNA (Doxorrubicina 1 µM – controle DXR), e três diferentes concentrações de ambas formas de β-glucanas (5, 50 e 100 µg/mL), e a concentração mais alta, 100 µg/mL também associada ao indutor de danos, sendo cada tratamento realizado em triplicata. As células (10^5 por poço) foram cultivadas em placas de seis poços por um período de incubação de 24 horas, então foram tratadas e após 3 horas de exposição ao tratamento, as células foram soltas do fundo do frasco com tripsina 0,1% (300 µL), centrifugadas (5 min, 1000 rpm) e ressuspensas em meio de cultura (500 µL), em seguida, foram suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (*Low Meeting Point*) e

distribuídas em laminas pré-gelatinizadas (com agarose normal). As células foram lisadas por 60 min à 4°C e submetidas a condições alcalinas por 20 min. As laminas foram levadas à eletroforese que foi realizada em pH 13, 25 V, 300 mA durante 20 minutos. Após isso, as lâminas foram neutralizadas com solução de neutralização e fixadas em álcool absolutos, secadas e levadas a geladeira para posterior coloração. Para análise, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio (2 µg/ml) e analisadas visualmente ao microscópio. As imagens (cometas) foram classificadas visualmente utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 400x sendo analisados 100 células por tratamento.

Os cometas foram classificados em classe 0: ausência de cauda; classe 1: cauda pequena com o tamanho até uma vez o diâmetro da cabeça do cometa; classe 2: cauda de tamanho médio, entre uma a duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: cauda longa, com comprimento superior a duas vezes o diâmetro da cabeça. O *Score* é obtido através do cálculo: $Score = (N^{\circ} \text{ nucleoide classe } 0 \times 0) + (N^{\circ} \text{ nucleoide classe } 1 \times 1) + (N^{\circ} \text{ nucleoide classe } 2 \times 2) + (N^{\circ} \text{ nucleoide classe } 3 \times 3)$. Foram realizados três experimentos contendo duas repetições cada um.

2.7 CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL (RTCA)

Foi realizado através do aparelho *xCELLigence* RTCA – *Real Time Cell Analyzer* – ROCHE, em placa específica do equipamento, com 96 poços. Inicialmente é realizado o *background* com 50 µL de meio de cultura para o aparelho identificar a menor impedância e posteriormente cada poço com exceção do branco, recebeu 100 µL de meio de cultura contendo 3125 células. Aguardado 24 horas para estabilização. Após esses período, foi adicionado 50 µL de cada tratamento finalizando 200 µL por poço com as diferentes concentrações das duas formas de β-glucanas sendo 5, 50 e 100 µl/mL. A concentração mais alta (100 µg/mL) foi associada a doxorubicina 0,5 µM. Como controle foi utilizado células e meio de cultura sem tratamento e como controle positivo, doxorubicina 0,5 µM (controle DXR). O tratamento foi monitorado em tempo real por 96 horas. Foram realizados três experimentos contendo triplicatas por cada um.

2.8 EXPRESSÃO GÊNICA

As células (10^6) foram incubadas em frascos de 25 cm² contendo 5 mL de meio para crescimento por um ciclo celular (24 h), descartado o meio, lavado com PBS, em seguida adicionado 5 mL de meio contendo 5 µg/mL de diferentes formas de β-glucanas em cada frasco e o controle e mantidas por 6 horas de tratamento. Após o período do tratamento, o meio foi retirado e extraído o RNA total utilizando lise por Trizol LS (Invitrogen, *Life Technology*) seguido de extração por RNeasy® Mini Kit Qiagen (Cat. N° 74106), segundo protocolo: Foi adicionado 1 mL de Trizol LS por frasco, aguardado 5 minutos à temperatura ambiente. Após as células se soltarem, todo conteúdo foi transferido a microtubo de 1,5 mL, aguardado mais 5 minutos e acrescentados 200 µL de clorofórmio puro a temperatura ambiente. Os microtubos foram agitados por 10 segundo em vortex e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4 °C por 20 minutos a 12000 rpm), 400 µL da fase superior foi transferido para outro microtubo livre de RNase, onde foi adicionado 400 µL de etanol 70%. As amostras foram transferidas para os microtubos do Kit com coluna de separação do RNA de proteínas ou DNA, centrifugadas por 15 segundos a 8000 x G. Foi descartado o fluxo, adicionado 700 µL de Tampão RW1 (KIT) e centrifugado por 15 segundos a 8000 G. Novamente foi descartado o líquido que passou pelo tubo de separação e adicionado 500 µL de Tampão RPE (KIT), centrifugado por 15 segundos a 8000 x G. Foi repetido este último processo e a coluna de secagem foi trocada e centrifugada por 2 minutos a 8000 G, foi trocado para o tubo coletor e adicionado 50 µL de água aquecida livre de RNase e centrifugada por 1 minuto a 8000 G. O RNA foi estocado em freezer -80 para posterior utilização. Posteriormente, uma parte da amostra foi encaminhada para leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, *Thermo Scientific*) para cálculo da concentração de RNA, e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8%, sendo a razão (260/280) obtida entre 1,8 e 2. Foram realizados três experimentos.

A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100™ *Thermal Cycler* BIO-RAD, onde 1000 ng de RNA foram diluídos em 8 µL de H₂O DEPC, 4 µL de oligo dT (20 pmd/mL) e 4 µL de dNTPs (2,5 mM), mantidas por 15 minutos a 60 °C. Em seguida foram colocadas em gelo, e adicionado mais 1,3 µL de H₂O DEPC, 2 µL de Tampão 10X, 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,05 µL de RNA out e 0,05 µL de enzima transcriptase reversa (M-MLV – *Invitrogen, Life Technologies*) por amostra e mantidas por mais 50 minutos a 60 °C.

Para PCR foi utilizado o composto fluorescente (5 µL) Plantion SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), além de 1 µL de cada par de oligonucleotídeos, e 5 µL de cDNA (50 ng/µL) de cada amostra.

As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 5 minutos e 40 ciclos de [95 °C/15 segundos, 60 °C/ 15 segundos] no aparelho CFX96™ *Real-Time System* BIO-RAD. A análise da curva de *Melting* foi realizada no final de cada reação com temperatura de 55 °C A 95 °C a cada 0,5 graus por 20 segundos. As reações RT foram realizadas em triplicata.

Os dados foram normalizados com os valores de expressão do gene *β-ACTINA*, os quais foram amplificados em cada conjunto de experimentos de qPCRs. A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada pelo programa *LinRegPCR*, versão 2013.1, dezembro 2013 (RUIJTER et al. 2009; RUIJTER et al. 2013).

Os genes utilizados foram *CCNA2* (*Ciclina A2*), *CCNB1* (*Ciclina B1*), *CCNE1* (*Ciclina E1*), *CCND1* (*Ciclina D2*), *P53* (*Tumor Protein 53*), *CHECK1* (*checkpoint Kinase 1*) e *CHECK2* (*checkpoint Kinase 2*) para estudo de ciclo celular.

Os genes *GADD45A* (*growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*), *GADD153* (*DNA-damage-inducible transcript 3*), *XPA* (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*), *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), *ERCC5* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5*) e *NFE2L2* (*nuclear factor, erythroid 2-like 2*) foram utilizados para estudos de reparos e estresse celular.

Os genes *BAK* (*BCL2-antagonist/killer 1*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*), *BCL-2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), *BCL-XL* (*BCL2-associated agonist of cell death*) e *CASP-9* (*Caspase 9*) foram utilizados para estudo de apoptose.

Os genes *MAP2K6* (*mitogen-activated protein kinase kinase 6*), *ABL1* (*c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*), *ABL2* (*c-abl oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase*), e *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) para estudo de crescimento, sobrevivência, remodelação do citoesqueleto, motilidade celular, adesão e metabolismo. A **Tabela-1** apresenta a lista e sequências de oligonucleotídeos utilizados.

Tabela-1 – Lista e seqüências de oligonucleotídeos utilizados, seqüências e referências.

NOME	SEQÜÊNCIA 5' - 3'	REFERÊNCIAS
<i>β-ACTINA</i>	F: 5' CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT 3' R: 5' AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG 3'	WESTERINK & SCHOONEN, 2007
<i>BAX</i>	F: 5' TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT GGG 3' R: 5' TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT 3'	*
<i>BAK</i>	F: 5' CAA GAT TGC CAC CAG CCT GTT TGA 3' R: 5' ATG CAG TGA TGC AGC ATG AAG TCG 3'	*
<i>BCL-2</i>	F: 5' CAG CTG CAC CTG ACG 3' R: 5' GCT GGG TAG GTG CAT 3'	KO et al., 2005
<i>BCL-XL</i>	F: 5' TGG GCT CAC TCT TCA GTC GGA AAT 3' R: 5' ATG TAG TGG TTC TCC TGG TGG CAA 3'	BAI et al., 2009
<i>CASP-9</i>	F: 5' GCT CTT CCT TTG TTC ATC TCC 3' R: 5' GTT TTC TAG GGT TGG CTT CG 3'	CHEN et al., 2009
<i>GADD45A</i>	F: 5' TCA GCG CAC GAT CAC TGT C 3' R: 5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'	THUM & BORLAK, 2008
<i>GADD153</i>	F: 5' AGC AGA TGT GCT TTT CCA GAC 3' R: 5' GTC CTC ATA CCA GGC TTC CA 3'	RAMIREZ et al., 2013 com Modificações
<i>P53</i>	F: 5' TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT 3' R: 5' GAC AGG CAC AAA CAC GCA C 3'	JAVELAUD & BESANCON, 2002 com Modificações
<i>CHECK1</i>	F: 5' GGT GAA TAT AGT GCT GCT ATG TTG ACA 3' R: 5' TTG GAT AAA CAG GGA AGT GAA CAC 3'	TANG et al., 2008
<i>CHECK2</i>	F: 5' CCC AAG GCT CCT CCT CAC A 3' R: 5' AGT GAG AGG ACT GGC TGG AGT T 3'	YE et al., 2012
<i>XPA</i>	F: 5' GCT GCC CGG CCC TAC T 3' R: 5' GCC TCC TCC TGT GTC AAT TAT CTT 3'	*
<i>PCNA</i>	F: 5' AGG CAC TCA AGG ACC TCA TCA 3' R: 5' GAG TCC ATG CTC TGC AGG TTT 3'	CHEN et al., 2013
<i>ERCC5</i>	F: 5' CGC TCC CAT TAG TGC CGT C 3' R: 5' TCC CTG CTC CTA CAC AAC AA 3'	*
<i>NFE2L2</i>	F: 5' CGT TTG TAG ATG ACA ATG AGG 3' R: 5' AGA AGT TTC AGG TGA CTG AG 3'	*
<i>ABL1</i>	F: 5' CGA AGG GAG GGT GTA CCA TTA C 3' R: 5' CGT TGA ATG ATG ATG AAC CAA CTC 3'	*
<i>ABL2</i>	F: 5' CAT CCG TCC ATC TGC TCA GAC 3' R: 5' GGA CAG TAG GTC AGC ACA TTC 3'	SRINIVASAN & PLATTNER, 2006
<i>MAP 2K6</i>	F: 5' AGT CTG TTT TGC AAG GTG TGC AT 3' R: 5' GCA GGC GTG CAA TCT TCA 3'	*
<i>CCNA2</i>	F: 5' GAC CCT GCA TTT GGC TGT G 3' R: 5' ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG 3'	HSIEH, 2006
<i>CCNB1</i>	F: 5' AGA GCA TCT AAG ATT GGA GAG 3' R: 5' CCA TGT CAT AGT CCA ACA TAG 3'	*
<i>CCNE1</i>	F: 5' GAC TTA CAT GAA GTG CTA CTG 3' R: 5' GAC GAG AAA TGA TAC AAG GC 3'	*
<i>CCND1</i>	F: 5' GCC TCT AAG ATG AAG GAG AC 3' R: 5' CCA TTT GCA GCA GCT C 3'	*
<i>GAPDH</i>	F: 5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3' R: 5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'	SUGAYA, et al., 2005

(*) Oligonucleotídeos adquiridos

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios do MTT, Vermelho Neutro e Hemólise, os valores mesurados foram comparadas por ANOVA seguida de Tukey ($p < 0,05$). Para o Ensaio do Cometa, os valores do *score* foram comparadas por ANOVA seguida de Tukey ($p < 0,05$). Para o Ensaio de Cinética de Proliferação Celular (RTCA), os valores de Índice Celular nos momentos de 24, 48 e 72 horas de tratamento foram comparadas por ANOVA seguida de Tukey ($p < 0,05$), realizado através do programa *GraphPad Prism 5*.

A análise dos dados de expressão gênica foi realizada com o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa *Rest 2009* (PFAFFL, 2002) tendo significância estatística estabelecida em $p < 0,05$. Sendo considerado significativo com diferença de expressão acima de 2 vezes.

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

Os resultados de citotoxicidade obtidos nos três tempos de avaliação de ambas formas de β -glucanas estão apresentadas em forma de viabilidade celular em percentagem na **Figura-1**. As β -glucanas não sulfatadas não apresentaram redução de viabilidade apenas na concentração mais baixa (5 $\mu\text{g/mL}$), tendo as demais concentrações (10, 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$) diminuído a viabilidade celular de maneira dose dependentes em todos os tempos testados (24, 48 e 72 horas). As β -glucanas sulfatadas apresentaram redução significativa de viabilidade na concentração mais baixa em 24 e 48 horas de tratamentos, não tendo diferença significativa com relação ao controle negativo após 72 horas, as demais concentrações reduziram a viabilidade celular de maneira dose dependente. Tendo as β -glucanas sulfatadas, reduzido mais significativamente a viabilidade com relação as β -glucanas não sulfatadas. Este ensaio também foi realizado com duas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de ambas β -glucanas associada ao indutor de danos doxorubicina 1 μM por 24 horas. Para as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, observamos que houve diferença significativa na viabilidade celular quando as β -glucanas sulfatadas foram associadas a DXR, com relação a diminuição da viabilidade causada pela DXR, resultados diferente do associado de β -glucanas não sulfatadas, no qual a diferença não foi significativa. A **Figura-2** mostra os resultados dos tratamentos associados para este ensaio.

Figura-1 – Valores de Viabilidade Celular após 24 (a), 48 (b) e 72 horas (c) de tratamento com β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) nas concentrações de 5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100 μ g/mL em células MCF-7; Controle é considerado 100 %. (*) indicam valores estatisticamente significativos em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$; (#) indicam valores estatisticamente significativo em relação ao respectivo controle DXR 1 μ M, $p < 0,05$. Absorbância em comprimento de onda de 540 nm.

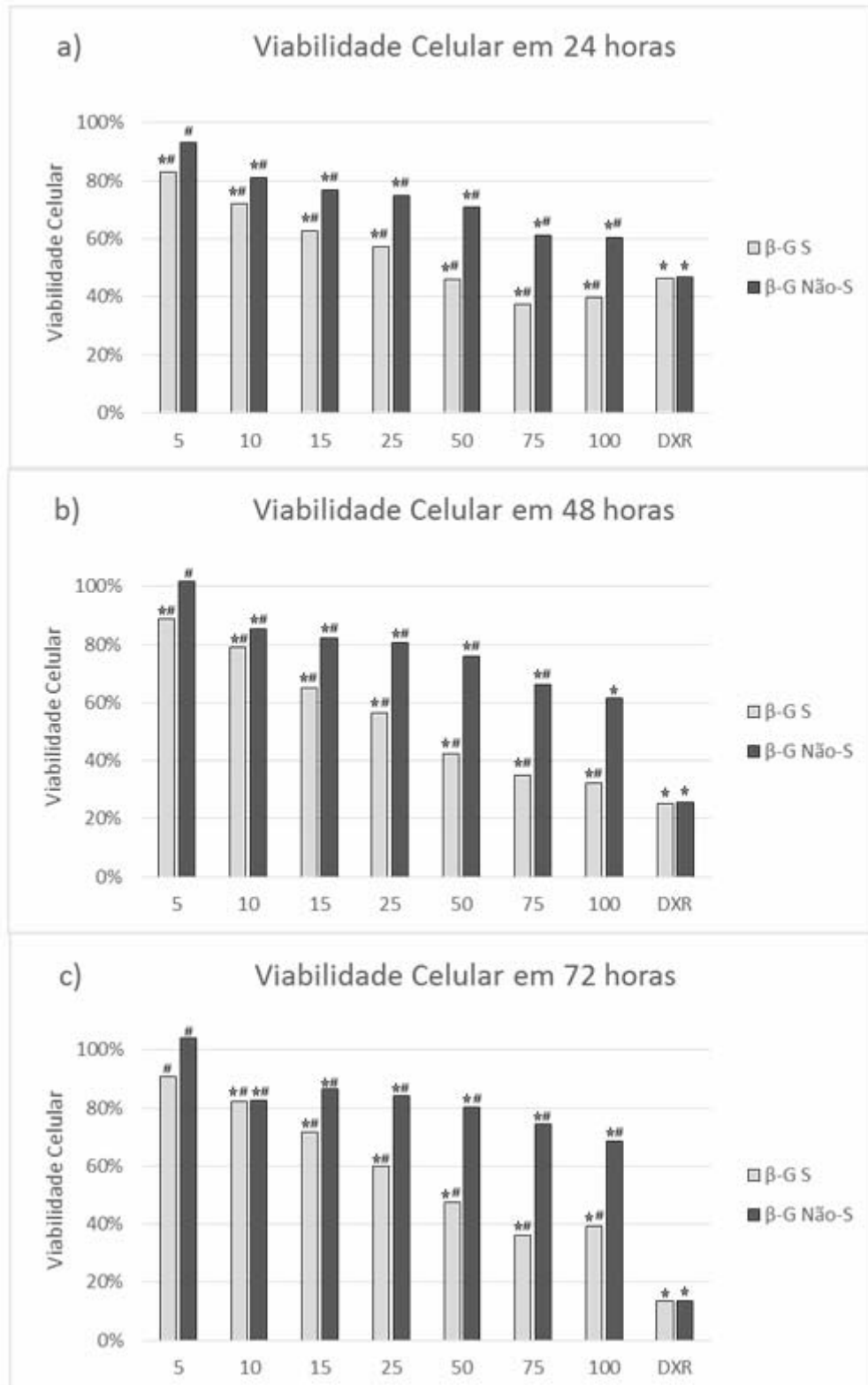
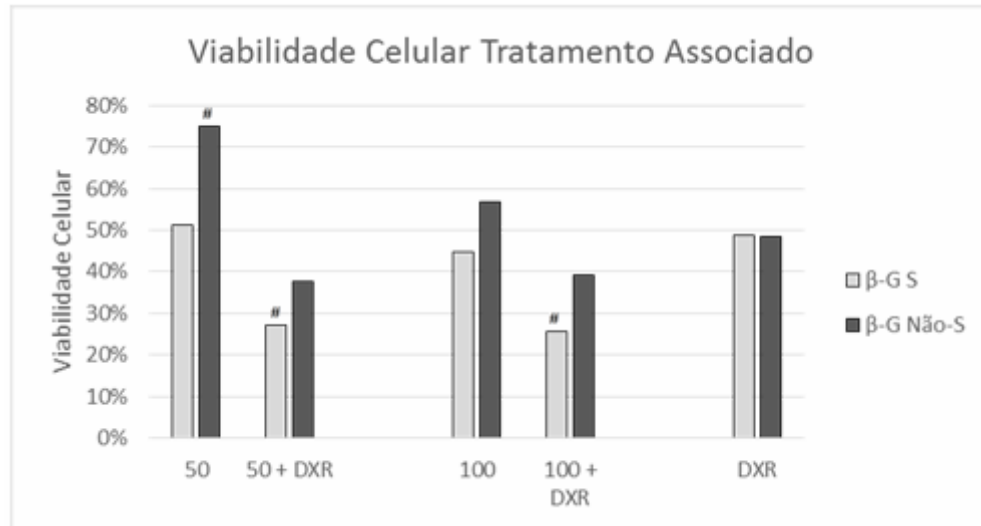


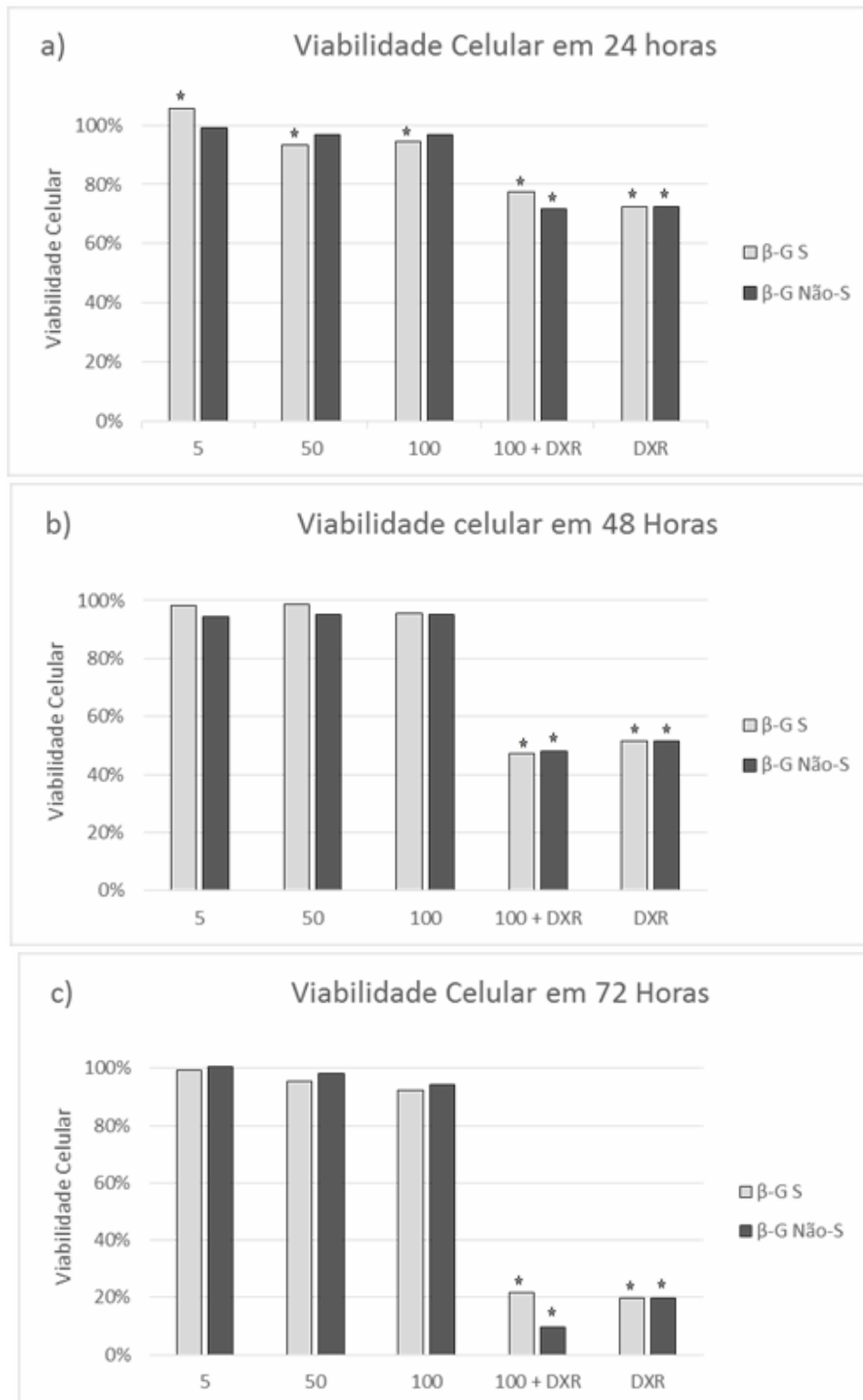
Figura-2 – Valores de Viabilidade Celular após 24 horas de tratamento com β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e estas concentrações associadas ao indutor de danos doxorubicina (DXR) em células MCF-7. Controle é considerado 100 %; (#) indicam valores estatisticamente significativos em relação ao controle DXR 1 μM) $p < 0,05$. Absorbância em comprimento de onda de 540 nm.



3.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (VERMELHO NEUTRO)

Os resultados de citotoxicidade obtidos nos três tempos para ambas formas de β -glucanas estão apresentadas em forma de Viabilidade Celular na **Figura-3**. As β -glucanas sulfatadas apresentaram baixa interferência na viabilidade celular, porém significativa nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou aumento significativo de absorbância em 24 horas de tratamento. As β -glucanas não sulfatadas não apresentaram diminuição de viabilidade significativa em nenhuma das concentrações testadas em 24 horas. Os tratamentos associados não apresentaram diferença significativa com relação ao respectivo controle DXR (doxorubicina 0,5 μM) em todos os tempos de tratamento. Nos tempos testados de 48 e 72 horas todas as concentrações testadas de ambas formas de β -glucanas não apresentaram diminuição de viabilidade celular significativa com relação ao respectivo controle negativo.

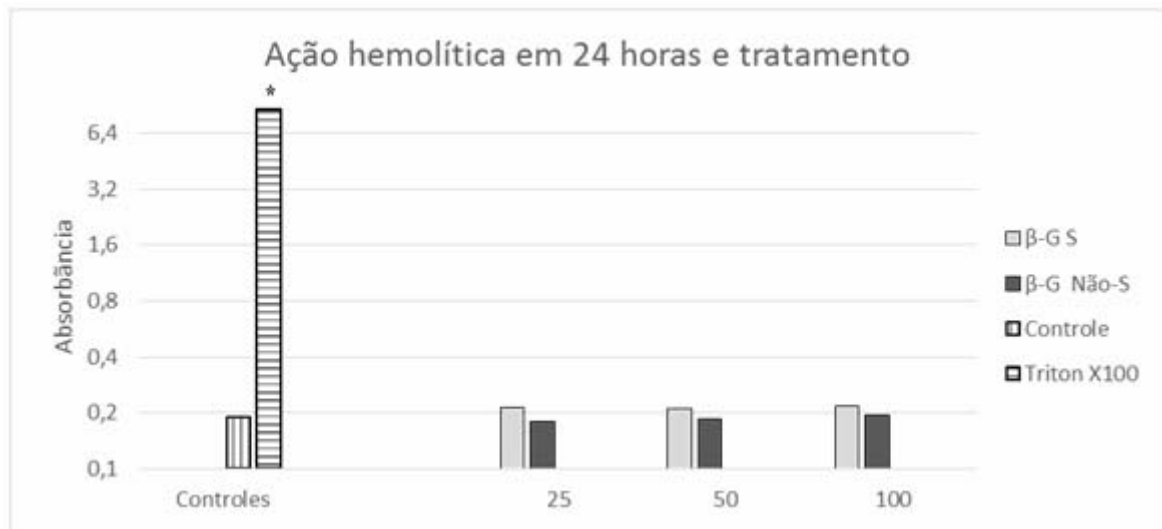
Figura-3 – Valores de Viabilidade Celular após 24 (a), 48 (b), e 72 horas (c) de tratamento com β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ associada a DXR 0,5 μM em células MCF-7; (*) indicam valores estatisticamente significativos em relação ao respectivo controle, $p < 0,05$. Controle é considerado 100 %. Nenhum dos tratamentos associados apresentou valores estatisticamente significativos em relação ao respectivo controle DXR 0,5 μM) $p < 0,05$. Absorbância em comprimento de onda de 540 nm.



3.3 ENSAIO DE HEMÓLISE

A **Figura 4** apresenta os resultados obtidos pelo Ensaio de Hemólise, onde três concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de ambas formas de β -glucanas foram testadas com relação a sua ação hemolítica em 24 horas de tratamento. Não houve diferença significativa para todas as concentrações com relação ao controle por ambas formas de β -glucanas neste tempo de tratamento.

Figura-4 – Valores de absorvância em comprimento de onda de 414 nm após 24 horas de tratamento com β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ comparadas aos controles (sem tratamento), e controle de danos (lise de hemácias com Triton X100 2 $\mu\text{L/mL}$). (*) indica valor estatisticamente significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.



3.4 ENSAIO DO COMETA

A **Tabela -1** mostra a média e desvio padrão do número de células com as diferentes classes de danos observados pelo Ensaio do Cometa e seus respectivos *scores*. A **Figura-5** apresenta os resultados deste ensaio após os tratamentos por duas formas de β -glucanas em três concentrações diferentes sendo 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e uma associação da concentração mais alta, (100 $\mu\text{g/mL}$) com o agente indutor de danos no DNA, doxorubicina (1 μM). Observa-se que todas as concentrações de ambas formas de β -glucanas não apresentaram danos significativos ao DNA no tempo testado de 3 horas. Apesar do pequeno aumento dos danos apresentado pelo tratamento com a concentração mais alta de β -glucanas sulfatadas, este aumento não foi significativo com relação ao controle. Apesar de ambas associações terem

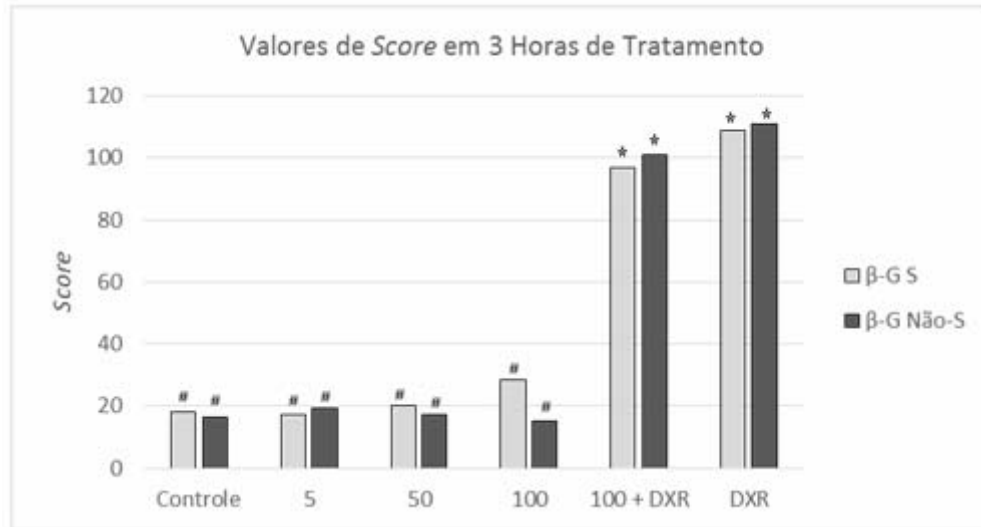
apresentado uma leve diminuição dos danos causados pela DXR neste ensaio, esta diminuição não foi significativa com relação aos danos no controle DXR.

Tabela-1 – Números (Médio \pm Desvio Padrão (DP)) de células encontradas com seus respectivos danos classificados de 0 a 3 após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações: 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de ambas formas de β -glucanas, e associação da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ambas forma de β -glucanas e doxorrubicina 1 μM (DXR), juntamente com os controles e controle DXR 1 μM em células MCF-7, e os respectivos *Scores* obtidos.

β-GLUCANAS NÃO SULFATADAS										
TRATAMENTOS	CLASSES								SCORE	
	0		1		2		3			
	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP
Controle	84	\pm 5	15,66	\pm 5,03	0,33	\pm 0,57	0	\pm 0	16,333	\pm 5,033
5 $\mu\text{g/mL}$	80,66	\pm 1,15	19,33	\pm 1,15	0	\pm 0	0	\pm 0	19,333	\pm 1,154
50 $\mu\text{g/mL}$	82,66	\pm 5,85	17,33	\pm 5,85	0	\pm 0	0	\pm 0	17,333	\pm 5,859
100 $\mu\text{g/mL}$	84,66	\pm 4,72	15,33	\pm 4,72	0	\pm 0	0	\pm 0	15,333	\pm 4,725
100 $\mu\text{g/mL}$ + DXR 1 μM	24,66	\pm 2,51	51	\pm 6,24	23	\pm 4,58	1,33	\pm 1,15	101	\pm 1,732
DXR 1 μM	16,33	\pm 2,3	58,66	\pm 5,03	22,66	\pm 5,5	2,33	\pm 0,57	111	\pm 6,082

β-GLUCANAS SULFATADAS										
TRATAMENTOS	CLASSES								SCORE	
	0		1		2		3			
	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP	MÉDIA	\pm DP
Controle	82	\pm 1,73	18	\pm 1,73	0	\pm 0	0	\pm 0	18	\pm 1,732
5 $\mu\text{g/mL}$	82,66	\pm 2,3	17,33	\pm 2,3	0	\pm 0	0	\pm 0	17,33	\pm 2,309
50 $\mu\text{g/mL}$	80,33	\pm 7,09	19	\pm 6,55	0,66	\pm 0,57	0	\pm 0	20,33	\pm 7,637
100 $\mu\text{g/mL}$	72,33	\pm 5,5	27	\pm 6,24	0,66	\pm 1,15	0	\pm 0	28,33	\pm 4,932
100 $\mu\text{g/mL}$ + DXR 1 μM	28	\pm 9,16	50	\pm 11	19	\pm 2,64	3	\pm 0	97	\pm 7,81
DXR 1 μM	22,66	\pm 8,32	47	\pm 11,53	26	\pm 4	4,33	\pm 1,52	112	\pm 6

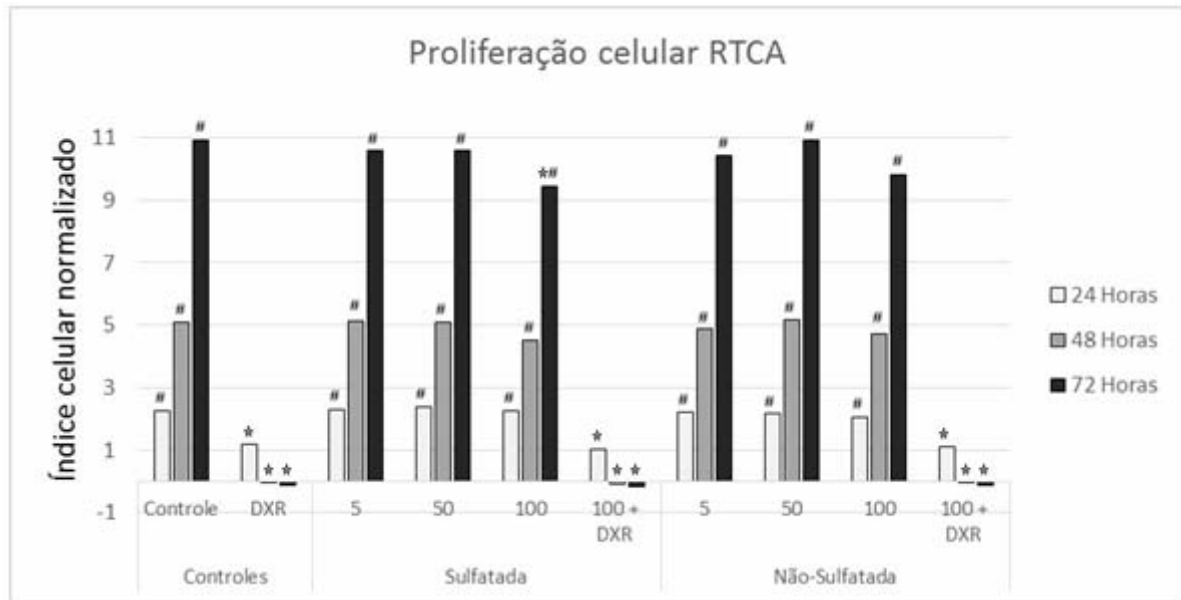
Figura-5 – Valores de Score em 3 horas de tratamento com β -glucanas sulfatadas (β -G S), e β -glucanas não sulfatadas (β -G Não-S) nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ associada a DXR 1 μM em células MCF-7; (*) indica valores estatisticamente significativo em relação ao controle, $p < 0,05$; (#) indica valores estatisticamente significativos em relação ao controle DXR 1 μM $p < 0,05$.



3.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL (RTCA)

As **Figuras-6 e 7** mostram as curvas de proliferação em índice celular nos tratamentos por β -glucanas sulfatadas e não sulfatadas respectivamente. As concentrações mais baixas testadas (5 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de ambas formas de β -glucanas não apresentaram interferência significativa na proliferação celular durante o tempo de tratamento de 96 horas. Já a concentração mais alta (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentou redução significativa em 72 horas para o tratamento com as β -glucanas sulfatadas, entretanto, foi não significativo para o tratamento com β -glucanas não sulfatadas. Nos tratamentos associados (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Doxorubicina 0,5 μM) não houve alteração significativa com relação ao controle positivo para ambas formas de β -glucanas, porém o tratamento com β -glucanas sulfatadas apresentou tendência de aumento de morte com relação ao controle positivo. A **Figura-8** mostra os valores de índice celular normalizado nos pontos de 24, 48 e 72 horas de tratamento, as respectivas concentrações utilizadas e controles.

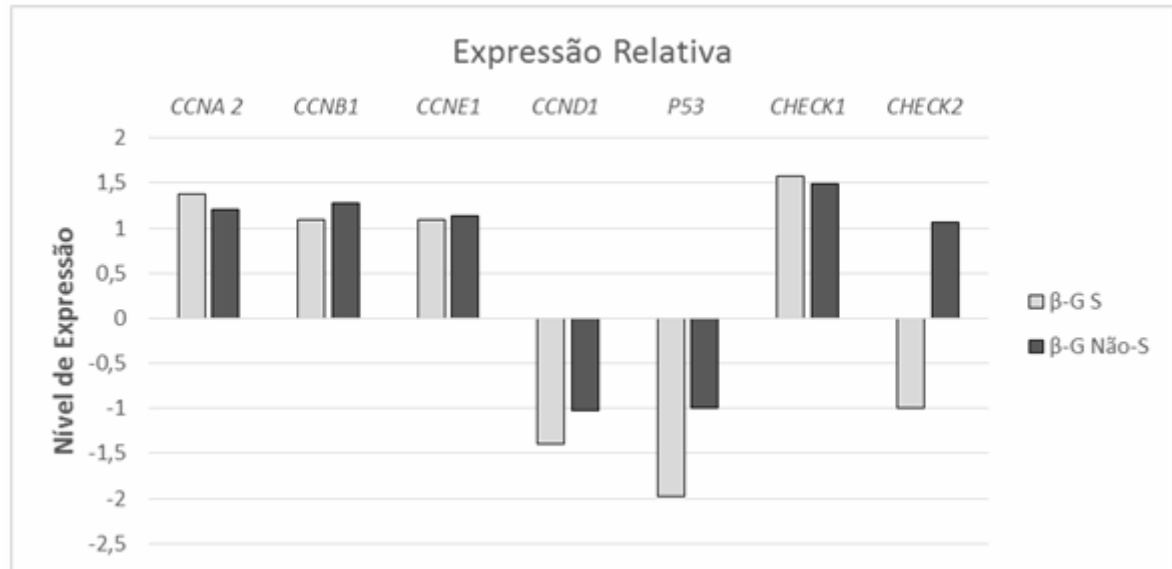
Figura-8 – Valores de índice celular normalizado nos pontos de 24, 48 e 72 horas de tratamento e as respectivas concentrações utilizadas e controles em células MCF-7. (*) indica valores estatisticamente significativos em relação aos respectivos controles, $p < 0,05$; (#) indica valores estatisticamente significativos em relação aos respectivos controles DXR (Doxorrubicina 0,5 μM) $p < 0,05$.



3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

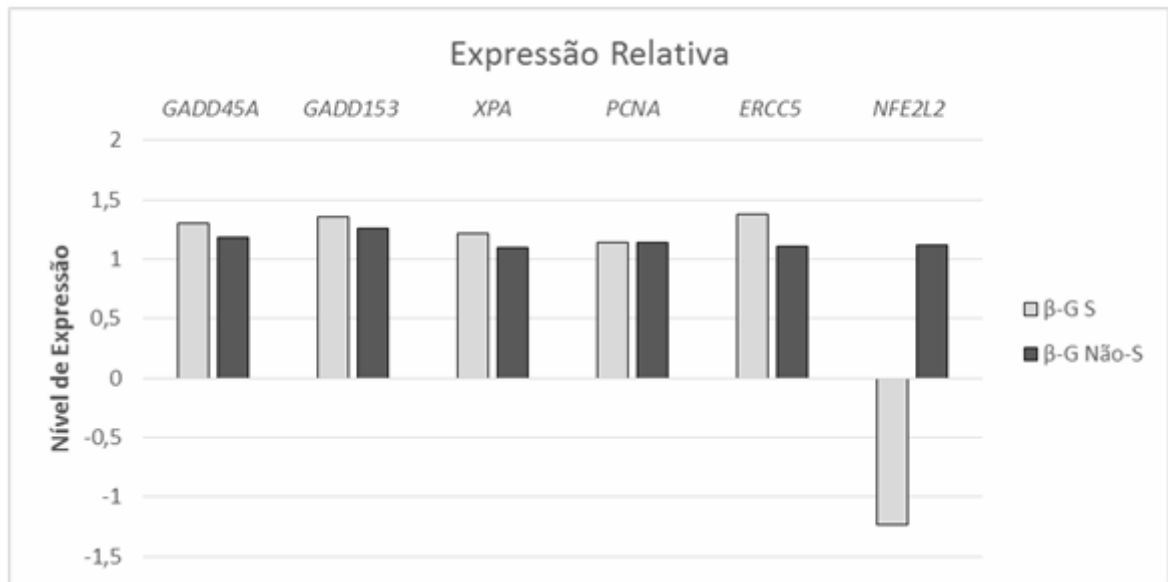
Em ensaios pilotos verificou-se que todos os genes de referência (*GAPDH* e β -*ACTINA*) utilizados apresentavam diminuição de expressão quando as células eram tratadas com as concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucanas sulfatadas nos tempos de 6, 12 e 24 horas de tratamentos (dados não apresentados). Apenas a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ em 6 horas de tratamentos não apresentaram variação na expressão do gene de referência utilizado. A **Figura-9** mostra os resultados da expressão de genes utilizados para estudo de ciclo celular *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CCND1*, *P53*, *CHECK1* e *CHECK2*, os quais não apresentaram diferença de expressão relativa depois de normalizados com o gene constitutivo β -*ACTINA* após o tratamento com as diferentes β -glucanas na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 6 horas.

Figura-9 – Análise de RTq-PCR em tempo real dos genes *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CCND1*, *P53*, *CHECK1* e *CHECK2* em células MCF-7 tratadas com β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) (5 μ g/mL) durante 6 horas. Todos os genes não apresentaram diferença significativa na expressão para ambos tratamentos. As expressões foram normalizadas utilizando o Cq obtidos para o gene da β -ACTINA.



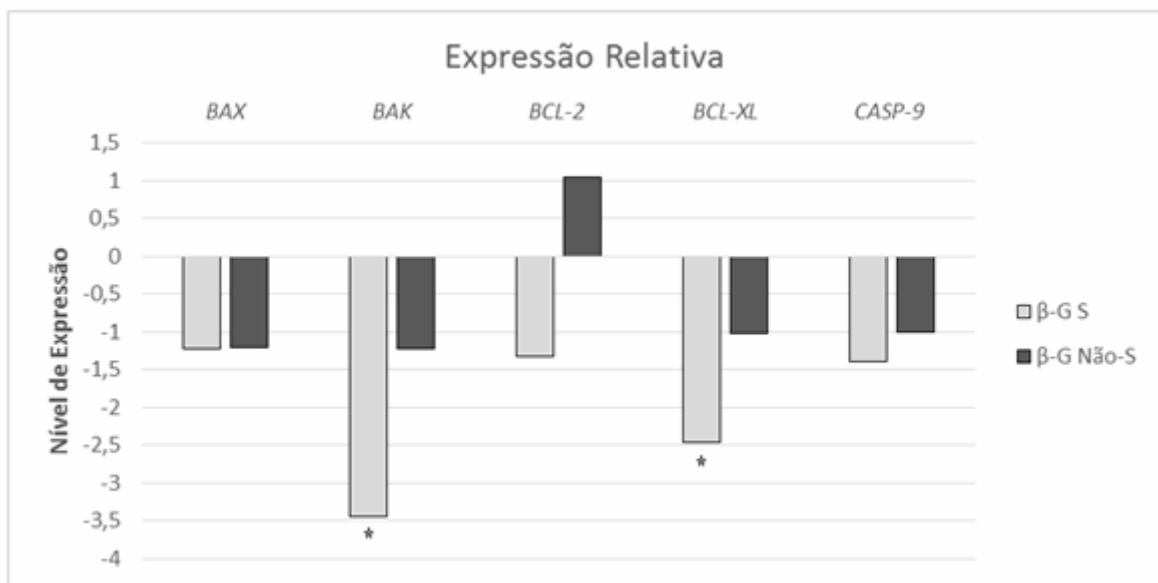
A **Figura-10** mostra os resultados da expressão de genes utilizados para estudo de reparos e estresse celular *GADD45A*, *GADD153*, *XPA*, *PCNA*, *ERCC5* e *NFE2L2*, os quais não apresentaram diferença de expressão relativa depois de normalizados com o gene constitutivo β -ACTINA após o tratamento com as diferentes β -glucanas na concentração de 5 μ g/mL durante 6 horas.

Figura-10 – Análise de RTq-PCR em tempo real dos genes *GADD45A*, *GADD153*, *XPA*, *PCNA3*, *ERCC5* e *NFE2L2* em células MCF-7 tratadas com β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) (5 μ g/mL) durante 6 horas. Todos os genes não apresentaram diferença significativa na expressão para ambos tratamentos. As expressões foram normalizadas utilizando o Cq obtidos para o gene da β -*ACTINA*.



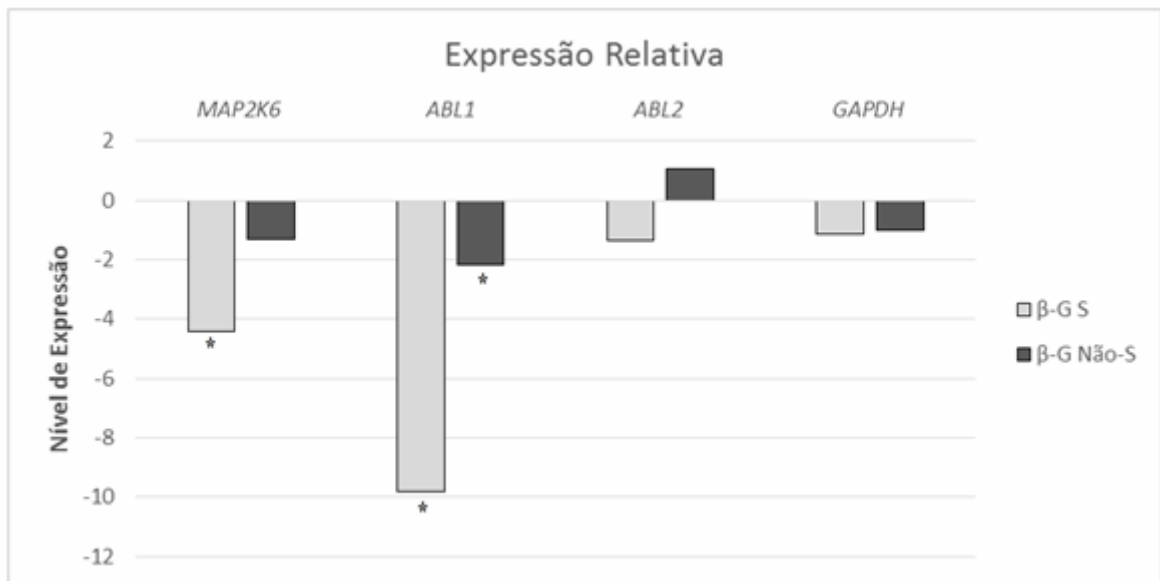
A **Figura-11** mostra os resultados da expressão de genes utilizados para estudo de apoptose *BAK*, *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL* e *CASP-9*, os quais não apresentaram diferença de expressão relativa depois de normalizados com o gene constitutivo β -*ACTINA* após o tratamento com β -glucanas não sulfatadas na concentração de 5 μ g/mL durante 6 horas, porém, o tratamento com β -glucanas sulfatadas induziu redução significativa de expressão dos genes *BAK* (3,44 vezes) e *BCL-XL* (2,46 vezes), sendo a expressão dos genes *BAX*, *BCL-2* e *CASP-9* não diferenciadas significativamente.

Figura-11 – Análise de RTq-PCR em tempo real dos genes *BAX*, *BAK*, *BCL-2*, *BCL-XL* e *CASP-9* em células MCF-7 tratadas com β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) (5 μ g/mL) durante 6 horas. Os genes *BAX*, *BCL-2* e *CASP-9* não apresentaram diferença significativa na expressão para ambos tratamentos. Os genes *BAK* e *BCL-XL* apresentaram diminuição significativa para o tratamento com β -glucanas sulfatadas (3,4 e 2,4 vezes respectivamente), porém não houve variação da expressão para o tratamento com β -glucanas não sulfatadas. (*) indicam diferença significativa com relação ao controle e nível de expressão diferente acima de 2 vezes. As expressões foram normalizadas utilizando o Cq obtidos para o gene da β -ACTINA.



A **Figura-12** mostra os resultados da expressão de genes utilizados para estudo de crescimento, sobrevivência, remodelação do citoesqueleto em resposta a estímulos extracelulares, motilidade celular, adesão e metabolismo - *MAP2K6*, *ABL1*, *ABL2*, e *GAPDH* depois de normalizados com o gene constitutivo β -ACTINA após o tratamento com β -glucanas não sulfatadas na concentração de 5 μ g/mL durante 6 horas. O gene *ABL1* apresentou redução de expressão (2,1 vezes), sendo a expressão dos demais genes não alterada significativamente. Após o tratamento com β -glucanas sulfatadas na concentração de 5 μ g/mL durante 6 horas, os genes *MAP2K6* e *ABL1* apresentara redução significativa de expressão (4,4 e 9,8 vezes respectivamente) sendo a expressão dos demais genes não alterada significativamente.

Figura-12 – Análise de RTq-PCR em tempo real dos genes *MAP2K6*, *ABL1*, *ABL2* e *GAPDH* em células MCF-7 tratadas β -glucanas sulfatadas (β -G S) e não sulfatadas (β -G Não-S) (5 μ g/mL) durante 6 horas. O gene *ABL1* apresentou diminuição significativa para os tratamentos com β -glucanas sulfatadas (9,8 vezes) e β -glucanas não sulfatadas (2,1 vezes). O gene *MAP2K6* apresentou diminuição significativa para o tratamento com β -glucanas sulfatadas (4,4 vezes), porém não apresentou mudança significativa na expressão quando tratadas com β -glucanas não sulfatadas. (*) indicam diferença significativa com relação ao controle e nível de expressão diferente acima de 2 vezes. As expressões foram normalizadas utilizando o Cq obtidos para o gene da β -ACTINA.



4 DISCUSSÃO

Devido ao crescente interesse por descobrir novas substâncias com efeitos benéficos à saúde, e com a finalidade de melhorar as propriedades já conhecidas, algumas moléculas podem ser modificadas quimicamente sendo uma destas modificações a sulfatação. A sulfatação pode ser induzida ou ocorrer naturalmente em biomoléculas, tais como oligossacarídeos e polissacarídeos, e tem papel importante em funções fisiológicas em plantas e animais (MÉNARD et al., 2004). O presente estudo avaliou a citotoxicidade, genotoxicidade, proliferação celular e expressão de genes relacionado ao ciclo celular, reparo de material genético, apoptose, metabolismo e estresse oxidativo, buscando compreender melhor os mecanismos de ação que ambas formas de β -glucanas podem ter nas células.

No presente estudo, três diferentes ensaios de viabilidade celular foram realizados, sendo o ensaio do MTT, que determina a atividade metabólica mitocondrial e geralmente reflete o seu potencial de crescimento e sobrevivência. O ensaio do Vermelho Neutro, que proporciona uma estimativa do número de células viáveis em uma cultura, baseando-se na

quantidade de células com membranas íntegras e viáveis com capacidade de incorporar e armazenar o corante vermelho neutro em seus lisossomos (REPETTO et al., 2008). E o Ensaio de Hemólise, o qual foi utilizado para avaliar a capacidade de ambas as formas de β -glucanas de causar danos as membranas de hemácias.

Foi utilizado o ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular induzida tanto por β -glucanas sulfatadas quanto de β -glucanas não-sulfatadas. Observamos que a viabilidade foi reduzida de forma dose dependente. Além disso, foi observado que as β -glucanas sulfatadas apresentaram maior diminuição quando comparadas com as não sulfatadas. A sulfatação aumenta a solubilidade de β -glucanas (HAN et al., 2008), e nossos resultados indicam que o aumento da solubilidade também aumenta o potencial de diminuição de viabilidade com efeito dose-dependente. Estes resultados são semelhantes aos que foram encontrados por Zhang e colaboradores (2006a), que investigaram a citotoxicidade e proliferação pelo ensaio do MTT em células MCF-7 tratadas com β -glucanas carboximetilada, uma forma solúvel de β -glucanas, extraídas do cogumelo *Pleurotus tuber-regium*. O grupo testou 6 concentrações (12.5, 25, 50, 100, 200, e 400 $\mu\text{g/mL}$), onde a citotoxicidade também foi dose dependente e o IC50 obtido foi de aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$. Um segundo trabalho foi realizado no mesmo ano e liderado pelo mesmo autor (ZHANG et al., 2006b), onde avaliaram β -glucanas extraídas de fungo *Poria cocos* utilizando as mesmas condições. Novamente obtiveram resultados semelhantes, sendo a citotoxicidade dose dependente, porém com um IC50 de 400 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados demonstram que β -glucanas de diferentes fontes e formas podem apresentar diferentes níveis de citotoxicidade através do ensaio MTT.

Neste trabalho, quando ambas formas de β -glucanas nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram associadas a doxorrubicina (1 μM), observou-se diminuição de viabilidade celular com relação aos controles, sendo significativo para os tratamentos com β -glucanas sulfatadas. A doxorrubicina age produzindo radicais livres e intercala-se com o DNA inibindo de forma importante a topoisomerase II (DIAS et al., 2003), causando rupturas de filamentos únicos e duplos (ALMEIDA et al., 2005). Estes resultados sugerem que as duas formas de β -glucanas não reduzem os danos causados pela doxorrubicina neste ensaio e sim, que as β -glucanas sulfatadas estão potencializando seu efeito, sendo um resultado importante uma vez que estudos tem demonstrado que em diferentes tipos celulares, β -glucanas têm agido em diminuir os danos causados por diferentes agentes químicos. Oliveira e colaboradores (2006) sugerem que β -glucanas de cevada nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ associadas a MMS ou 2-aminoantraceno, apresentam tanto atividade desmutagênica quanto bio-antimutagênica em células CHO-K1. Estas concentrações apresentaram atividade quimiopreventiva para

ambos agentes indutores, contudo a diferença pode estar em relação aos agentes indutores utilizados e linhagens celulares.

O ensaio do MTT também pode ser utilizado para avaliar a proliferação celular (BERRIDGE & TAN, 1993). No presente trabalho, ao compararmos os resultados do Ensaio do MTT (ensaio colorimétrico) e da proliferação celular (RTCA), nota-se que há diferença nos resultados. Ao analisarmos os mecanismos de cada ensaio mais profundamente, observamos que a redução do corante tetrazólio (MTT) é dependente de NAD(P)H-, portanto, aumenta conforme a atividade metabólica. Células em repouso, tais como timócitos e esplenócitos viáveis, porém metabolicamente baixas, reduzem muito pouco MTT. Condições que diminuem a atividade metabólica mitocondrial podem, portanto, diminuir a redução de corante tetrazólio, sem afetar de fato, a viabilidade das células (BERRIDGE et al., 2005). Também há evidências de que o MTT é reduzido em outros compartimentos celulares que não as mitocôndrias como citoplasma e regiões da membrana plasmática (BERNAS & DOBRUCKI, 2002). Já a proliferação celular pelo ensaio RTCA é obtida através da impedância elétrica detectadas pelos eletrodos no fundo de cada poço da placa. A impedância é proporcional à área física ocupada pelas células. Conforme há alteração na área ocupada pelas células a cada leitura realizada, o aparelho converte estes valores em curva de crescimento ou índice celular. No presente trabalho, a redução de viabilidade celular encontrada no MTT pode ter ocorrido pela diminuição do metabolismo celular (mitocondrial) e não por morte de células propriamente, uma vez que os resultados dos ensaios de proliferação (RTCA), e citotoxicidade, - Vermelho Neutro e Hemólise - sugerem que não há morte celular.

Ao fim de cada tempo de tratamento para o ensaio do MTT neste trabalho, notava-se que as células tratadas com as diferentes concentrações de β -glucanas, em todos os tempos de tratamento de fato não eram visualmente diferentes dos respectivos controles negativos pela observação microscópica. Fato que foi confirmado nos resultados do Ensaio do Vermelho Neutro. Neste ensaio observamos que as concentrações utilizadas (5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) inicialmente tiveram significativa diminuição de viabilidade celular para as duas concentrações mais altas utilizadas no tratamento com β -glucanas sulfatadas, e para os tempos de 48 e 72 horas não apresentaram diferença significativa para os tratamentos. E para os tratamentos com β -glucanas não sulfatadas, não houve diferença em nenhum dos tempos e concentrações utilizadas, corroborando com os resultados do ensaio de proliferação pelo RTCA e não houve diferença significativa para os tratamentos associados. Outro ensaio utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o de hemólise. Não houve ação hemolítica após

24 horas de tratamento em todas as concentrações testadas. Esse resultado sugere que ambas β -glucanas não causam danos à membrana celular, o que já era esperado, uma vez que a cinética de proliferação não apresentou redução considerável com relação ao controle em 24 horas.

Com relação a genotoxicidade avaliada no Ensaio do Cometa, ambas as formas de β -glucanas não induziram danos no DNA e não protegeram contra os danos causados pela DXR 1 μ M em três horas de tratamento, apesar de haver uma pequena redução do *score*. A ausência de genotoxicidade observada corrobora com os resultados encontrados por Guterres e colaboradores (2005) e Angeli e colaboradores (2009a). Guterres e colaboradores (2005) estudaram o extrato de *A. blazei* em células de pulmão de hamster chinês, onde 3 mg de resíduo de extrato foram diluídos em 400 μ L de dimetil sulfóxido e 4600 μ L de PBS, e utilizaram como concentração final 60 μ L/mL desta solução para o Ensaio do Cometa. Neste ensaio não observaram qualquer efeito genotóxico, porém houve uma redução significativa dos danos no DNA causados por metilmetanosulfonato - MMS. Angeli e colaboradores (2009a) demonstraram que β -glucanas extraídas de *A. blazei* não exerceram efeitos genotóxicos ou mutagênicos nas concentrações de 7, 21 e 63 μ g/mL, porém apresentaram efeito protetor de forma dose dependente contra danos no DNA causados pelo benzo[a]pireno (20 μ M) na linhagem celular de hepatoma humano (HepG2) no ensaio do cometa. Neste, os autores sugerem que a β -glucanas atuem se ligando ao benzo[a]pireno ou capturando radicais livres produzidos durante a sua ativação e que a β -glucanas modulam o metabolismo celular.

Os dados do ensaio de proliferação (RTCA) corroboram com os resultados do Ensaio do Cometa com relação à ausência de genotoxicidade assim como a expressão de genes relacionados a danos e reparos do DNA. Se ambas as formas de β -glucanas causassem danos significativos ao material genético, as células deveriam diminuir o ciclo celular para realizar o reparo e, como observado, todas as concentrações testadas (5, 50 e 100 μ L/mL) de ambas as formas de β -glucanas não apresentaram diminuição na proliferação celular durante as primeiras horas de tratamento e houve pouca interferência em 96 horas.

Em relação aos dados de expressão dos genes estudados neste trabalho, observamos que a expressão dos genes utilizados para estudo de ciclo celular *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CCND1*, *P53*, *CHECK1* e *CHECK2* não apresentaram diferença significativa em ambos tratamentos com relação a expressão do gene β -*ACTINA* utilizado como controle. O gene *CCNA2* é essencial no controle do ciclo celular atuando em G1/S (início) e as transições de G2/M (HONDA et al., 2012). O gene *CCNB1* está envolvido na regulação da mitose e a proteína codificada pelo gene *CCNE1* é necessário para o ciclo celular na transição de G1/S,

esta proteína acumula-se no limite de fase G1/S e é degradada quando as células progredirem para a fase S, o gene *CCND1* está envolvida na transição da fase G1 para S (REZAEI et al., 2012). O gene P53 atua como um supressor tumoral em muitos tipos de tumores, induz a parada do crescimento ou a apoptose (SILVA et al., 2013). E os genes *CHECK1* e *CHECK2* estão envolvidos nos pontos de checagens do ciclo celular (FURGASON et al., 2013). Estes resultados corroboram com os dados do ensaio de Proliferação RTCA no momento de 6 horas, no qual nenhum dos tratamentos apresentou diferença com relação ao controle.

Em relação aos dados de expressão dos genes utilizados para estudos de reparos e estresse celular *GADD45A*, *GADD153*, *XPA*, *PCNA*, *ERCC5* e *NFE2L2*, observamos que não apresentaram diferença significativa em ambos tratamento com relação a expressão do gene β -*ACTINA* utilizado como controle. A expressão do gene *GADD45A* tem seu nível aumentado em condições de estresse e parada de crescimento ou em tratamento com agentes prejudiciais ao DNA (GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 2013), e o gene *GADD153* tem nível de expressão alterada em resposta ao estresse do retículo endoplasmático (DMITRIEVA et al., 2005). O gene *ERCC5* codifica uma proteína chave no reparo por excisão de nucleotídeos apoptose (SILVA et al., 2013). O gene *NFE2L2* codifica um fator de transcrição que é um membro de uma família de proteínas básicas de zíper de leucinas. Este fator regula genes que contêm elementos de resposta antioxidantes em seus promotores, muitos destes genes codificam proteínas envolvidas na resposta à lesão ao DNA e produção de radicais livres, com grande importância para o aumento da regulação coordenada de genes em resposta ao estresse oxidativo (KUMAGAI et al., 2013). Os genes *XPA*, *PCNA* e *ERCC5*, estão envolvidos na reparação de excisão, respostas a danos no DNA (KUBOTA et al., 2013; MELIS et al., 2013). O que demonstra que ambas formas de β -glucanas não causam estresse oxidativo, danos ou parada de crescimento celular na concentração utilizada em 6 horas de tratamento.

Em relação aos dados de expressão de genes relacionados a apoptose, observamos que houve redução significativa da expressão dos genes *BAK* (3,44 vezes) e *BCL-XL* (2,46 vezes) quando tratada com β -glucanas sulfatadas (5 μ g/mL) por 6 horas. Porém quando tratados com β -glucanas não sulfatadas, estes genes não apresentaram diferença significativa de expressão. Os genes *BAX*, *BCL-2* e *CASP-9* não apresentaram diferença significativa de expressão com relação ao controle para ambos tratamentos. Os genes *BAK* e *BCL-XL*, juntamente com os genes *BAX*, *BCL-2* e outros fazem parte da família BCL-2. *BAK* e *BAX* pertencem ao grupo que codificam proteínas pró-apoptóticas com papel central na apoptose mediada por mitocôndrias, as quais promovem a permeabilização da membrana mitocondrial externa, ativação de caspases e morte celular. Os genes *BCL-2*, *BCL-XL* codificam proteínas que

inativam as proteínas *BAX* e *BAK*, impedindo o processo apoptótico fazendo parte do grupo de proteínas antiapoptóticas. (SOMEYA et al., 2009). A redução de expressão do gene *BAK*, indica um aumento de proteínas antiapoptóticas em relação a proteínas pró-apoptóticas em células tratadas com β -glucanas sulfatadas, mesmo havendo diminuição significativa na expressão de *BCL-XL*. Levando em consideração que a expressão de *CASP-9* não foi alterada de maneira significativa, porém teve expressão reduzida 1,4 vezes para o tratamento com β -glucanas sulfatadas, podemos considerar que as células tratadas com esta concentração de β -glucanas sulfatadas não se apresentaram danificadas e não entram em apoptose, sendo desvantagem uma vez que se trata de linhagem de células cancerosas. Silva e colaboradores (2013) estudaram a expressão de *CASP-9* em células HepG2 quando tratadas por 6 horas com β -glucanas não sulfatadas (50 $\mu\text{g/mL}$) extraídas de *A. blazei*, e observaram que não houve alteração significativa na expressão deste gene, indicando que esta concentração no tempo utilizado não causou danos as células, as quais não foram levadas a apoptose. No entanto, β -glucanas apresentam diferentes resultados em diferentes tipos celulares. Kim e colaboradores (2009) investigaram a expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *CASP-3* em células SNU-C4 tratadas com β -glucanas produzidas por fermentação de estirpe mutante da espécie *Aureobasidium*. Os autores observaram que a expressão do *BCL-2* diminuiu 2 e 2,5 vezes quando tratadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucanas respectivamente. E a expressão de *BAX* foi aumentada em 1,7; 2,5 e 3,1 vezes quando tratadas com 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucanas respectivamente. A indução de apoptose foi confirmada através do ensaio de Tunel. Os autores utilizaram as mesmas condições da RT-PCR, tratamento com 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucanas por 24 horas, demonstrando o aumento de apoptose com o aumento da concentração. Essa diferença de resultado com relação ao presente trabalho se deu provavelmente pelo tempo de tratamento, as formas das β -glucanas e a linhagem celular utilizada.

Porém, alguns componentes das vias apoptóticas tem mostrado influencia no ciclo celular, ou por modular a proliferação de uma forma bastante geral ou controlando as fases específicas e também no metabolismo. Tanto *BCL-2* quanto *BCL-XL* funcionam como reguladores negativos do ciclo celular, *BCL-2*, através de inibição de CDK2, atrasa a transição G1/S, função semelhante foi atribuída ao *BCL-XL*. Já as proteínas *BAX* e *BAD* podem estimular a progressão do ciclo celular. Estas funções de regulação do ciclo para membros da família *BCL-2* é mediada por um domínio específico da proteína que não participa na regulação da apoptose. Além disso, proteínas da família *BCL-2* participam na regulação da morfologia e dinâmica mitocondrial tendo implicações importantes não só para a apoptose,

mas também para as funções bioenergéticas de mitocôndrias em diversas situações de estresse (GALLUZZI et al., 2012). Tais informações sugerem que os resultados encontrados no ensaio do MTT não refletem a sobrevivência das células, mas sim o metabolismo energético.

Em relação aos genes de crescimento, remodelação do citoesqueleto em resposta a estímulos extracelulares, motilidade celular, adesão e metabolismo *MAP2K6*, *ABL1*, *ABL2*, e *GAPDH*. Ao ser analisado a expressão de *MAP2K6*, foi observado que as células quando tratadas com 5 µg/mL de β-glucanas não sulfatadas não apresentaram alteração significativa na expressão de este gene (diminuição de 1,3 vezes). Porém, quando tratadas com 5 µg/mL de β-glucanas sulfatadas, observamos que houve uma redução de 4,4 vezes na expressão deste gene. *MAP2K6* codifica um membro da família da proteína-quinase de dupla especificidade, o MAP quinase quinase 6 (MAPKK6). MAPKK 6 também conhecidas como quinases reguladas por sinais extracelulares, atua como um ponto de integração para vários sinais bioquímicos. Esta proteína fosforila e ativa a p38 MAP quinase, em resposta a citocinas inflamatórias ou estresse ambiental. Como um componente essencial da p38 MAP quinase é mediada pela via de transdução de sinal, este gene está envolvido em muitos processos celulares, tais como a parada de ciclo celular induzida pelo estresse, ativação da transcrição e a apoptose (KAUR et al., 2010). Isso nos indica que nestas condições de tratamento, principalmente com as β-glucanas sulfatadas, as células não tiveram a necessidade parar o ciclo (como observado no ensaio de proliferação RTCA), não estavam sobre estresse, (como observado na expressão do gene *NFE2L2*), e não houve necessidade de entrarem em apoptose.

Ao ser analisado a expressão de *ABL1*, observamos que as células quando tratadas com 5 µg/mL de β-glucanas sulfatadas e não sulfatadas apresentaram alteração significativa na expressão de este gene (9,8 e 2,1 vezes respectivamente). Não houve diferença na expressão do gene *ABL2* para ambos tratamento com relação a expressão do gene normalizados. A família de *ABL* não receptoras de tirosina-quinases inclui *ABL1* e *ABL2*. *ABL1* está localizado em vários locais celulares tais como núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático, local onde interage com diversas proteínas celulares como quinases, fosfatases, proteínas reguladoras de ciclo celular, fatores de transcrição e citoesqueleto. Isso faz com que o transcrito deste gene esteja envolvido em diversos processos celulares como regulação do crescimento, sobrevivência celular, estresse oxidativo, respostas a danos e migração celular (SZCZYLIK et al., 1991). A baixa expressão deste gene sugere que as células, ao final de 6 horas de tratamento com β-glucanas, principalmente sulfatadas, modulam para a redução de danos e estresse. Para tratamentos com ambas β-glucanas (5 µg/mL), não houve diferença na expressão do gene *GAPDH*. Porém, testes pilotos indicaram

que em tempos de exposição e concentrações maiores, para o tratamento com β -glucanas sulfatadas (dados não apresentados) houve redução na expressão deste gene. Segundo Jurczyńska e colaboradores (2012), β -glucanas participam do processo de reparo, desintoxicação, neutraliza condições patológicas de estresse oxidativo e interferem no metabolismo. Também tem potencial para suplementação de alimentos com benefícios antioxidantes (KOFUJI et al., 2012). Contudo a diferença pode estar na concentração de β -glucanas e tempo de tratamento utilizados.

De maneira geral, ao analisar a diferença de expressão modulada por ambas formas de β -glucanas, observa-se diminuição de expressão de genes relacionados a apoptose, resposta de estresse celular e respostas a danos no DNA para o tratamento com β -glucanas sulfatadas, apenas o gene *ABL1*, relacionado ao estresse oxidativo e danos no DNA teve modulação de expressão significativa para o tratamento com β -glucanas não sulfatadas, estes resultados, juntamente com os resultados dos demais ensaios indicam maior potência de resposta para as moléculas sulfatadas.

Desta forma, os resultados obtidos sugerem que ambas as formas de β -glucanas extraídas de *A. brasiliensis* expostas a células MCF-7 não inibiram a proliferação celular de forma importante com exceção da concentração mais alta de β -glucanas sulfatada, e não apresentaram genotoxicidade, sendo um ponto negativo por ser linhagem tumoral. Porém quando β -glucanas sulfatadas foram associadas a DXR 1 μ M no MTT, observou-se que houve potencialização dos danos no DNA causados pela DXR, assim como observado no ensaio de proliferação RTCA (menos evidentes uma vez que a dose de DXR foi de 0,5 μ M). Esta potencialização indica que as β -glucanas, principalmente sulfatadas, podem ser bons candidatos a atuarem como adjuvante à doxorubicina para tratamento de portadores de câncer de mama sendo este um ponto positivo.

A diferença dos resultados encontrada nos ensaios do MTT e do Vermelho Neutro sugere que ambas formas de β -glucanas, principalmente a sulfatada, modulam o metabolismo mitocondrial, o qual não foi suficiente para alterar de forma importante a proliferação celular. Esta diferença entre os ensaios de citotoxicidade também reforça a importância da utilização de ensaios com diferentes mecanismos para ter resultados mais confiáveis. Os dados de expressão gênica sugerem que existe diferença na modulação de expressão de genes entre as duas formas de β -glucanas e que nas condições estudadas, ambas formas de β -glucanas não interferem no ciclo celular, as células não se apresentaram com danos no DNA ou estresse considerável e não houve indução de apoptose, sendo o contrário, mesmo a dose sendo baixa em curto período de tempo, as modulações dos genes *ABL-1* e *MAP2K6* surgem que células

tratadas com β -glucanas, principalmente sulfatadas apresentaram modulação para redução de danos ou estresse.

4.1 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

5 REFERÊNCIAS

- Akramiene, D., Aleksandraviciene, C., Grazeliene, G., Zalinkevicius, R., Suziedelis, K., Didziapetriene, J., Simonsen, U., Stankevicius, E., Kevelaitis, E. 2010. Potentiating effect of β -glucans on photodynamic therapy of implanted cancer cells in mice. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 220 (4), 299-306.
- Almeida, V. L., Leitão, A., Reina, L. C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L., Lopes, M. T. P. 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova* 28 (1), 118-129.
- Alves, M. G. Das C. F., Dore, C. M. P. G., Castro, A. J. G., Nascimento, M. S., Cruz, A. K. M., Soriano, E. M., Benevides, N. M. B., Leite, E. L. 2012. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology* 24, 1217-1227.
- Angeli, J. P. F., Ribeiro, L. R., Bellini, M. F., Mantovani, M. S. 2009. β -Glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. *Archives of Toxicology* 83, 81-86.
- Batbayar, S., Lee, D. H., Kim, H. W. 2012. Immunomodulation of Fungal β -Glucan in Host Defense Signaling by Dectin-1. *Biomolecules & Therapeutics* 20 (5), 433-445.
- Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Matuo, R., Terezan, A.P., Ribeiro, L.R.; Mantovani, M.S. 2006. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology in Vitro* 20, 355-360.
- Bernas, T., Dobrucki, J. 2002. Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. *Cytometry* 47, 236-242.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11, 127-152.

- Berridge, M. V., Tan, A. S. 1993. Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives Biochemistry Biophysics* 303, 474-482.
- Chang, Y. J., Lee, S., Yoo, M. A., Lee, H. G. 2006. Structural and Biological Characterization of Sulfated-Derivatized Oat β -Glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3815-3818.
- Chen, J., Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- glucans. *Mycological Research* 111 (6), 635-652.
- Chorvatovičová, D., Machová, E., Šandula, J. 1998. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration. *Mutation Research* 412, 83-89.
- Dias, M. A., Santana, A. E., Sobreira, M. R. F., Filho, E. C. 2003. Estudo de um modelo animal de hipoplasia sanguínea induzida pelo agente antineoplásico doxorubicina (adriplastina®). *Ars Veterinaria* 19 (3) 246-253.
- Dmitrieva, N. I., Burg, M. B. 2005. Hypertonic stress response. *Mutation Research* 569 (1-2), 65-74.
- Furgason, J. M., Bahassi, El, M. 2013. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 137 (3), 298 - 308.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G. 2013. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Reports* 13 (4), 322-330.
- Gameiro, P. H., Nascimento, J. S., Rocha, B. H, Piana, C. F., Santos, R. A., Takahashi, C. S. 2013. Antimutagenic Effect of Aqueous Extract from *Agaricus brasiliensis* on Culture of Human Lymphocytes. *Journal of Medicinal Food* 16 (2), 180-183.
- Geifman-Holtzman, O., Xiong, Y., Holtzman, E. J. 2013. Gadd45 stress sensors in preeclampsia. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 793, 121-129.
- Guterres, Z. Da R., Mantovani, M. S., Da Eira, A. F., Ribeiro, L. R., Jordão, B. Q. 2005. Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology* 28 (3), 458-463.
- Han, M. D., Han, Y. S., Hyun, S. H., Shin, H. W. 2008. Solubilization of water-insoluble β -glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Environmental Biology* 29 (2), 237-242.
- Honda, A., Valogne, Y., Bou Nader, M., Bréchet, C., Faivre, J. 2012. An intron-retaining splice variant of human cyclin A2, expressed in adult differentiated tissues, induces a G1/S cell cycle arrest in vitro. *PLoS One* 7 (6), 1 - 7.
- Hong, F., Yan, J., Baran, J. T., Allendorf, D. J., Hansen, R. D., Ostroff, G. R., Xing, P. X., Cheung, N. K., Ross, G. D. 2004. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *Journal of Immunology* 173, 797-806.

- Javelaud, D., Besancon, F. 2002. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40), 37949 - 37954.
- Jurczyńska, E., Saczko, J., Kulbacka, J., Kawa-Rygielska, J., Błazewicz, J. 2012. [Beta-glucan as a natural anticancer agent]. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 33 (196), 217-220.
- Kaur, R., Liu, X., Gjoerup, O., Zhang, A., Yuan, X., Balk, S. P., Schneider, M. C., Lu, M. L. 2010. Activation of p21-activated kinase 6 by MAP kinase kinase 6 and p38 MAP kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (5), 3323 - 3330.
- Kim, M., Hong, S. Y., Kim, S. K., Cheong, C., Park, H. J., Chun, H. K., Jang, K. H., Yoon, B. D., Kim, C. H., Kang, S. A. 2009. β -Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. *Nutrition Research and Practice* 3 (3), 180-184.
- Kim, Y. H., Paek, J. Y., Shin, H. W., Han, M. D. 2012. Single dose toxicity studies of sulfated water soluble beta-D-glucan in Sprague-Dawley rats. *Journal of Environmental Biology* 33 (6), 1107-1114.
- Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T., Murata, Y. 2012. Antioxidant Activity of β -Glucan. *ISRN Pharmaceutics* Id 125864.
- Kubota, T., Myung, K., Donaldson, A. D. 2013. Is PCNA unloading the central function of the Elg1/ATAD5 replication factor C-like complex?. *Cell Cycle* 12 (16), 2570 - 2579.
- Kumagai, Y., Kanda, H., Shinkai, Y., Toyama, T. 2013. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. In Press.
- Magnani, M., Gómez, R. J. H. C. 2008. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. *Semina: Ciências Agrárias* 29 (3), 631-650.
- Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P., Oliveira, R. J., Silva, A. F., Ribeiro, L. R. 2008. Beta-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutation Research* 658 (3), 154-161.
- Melis, J. P., Van Steeg, H., Luijten, M. 2013. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (18), 2409 - 2419.
- Ménard, R. 2004. b-1,3 Glucan Sulfate, but Not b-1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. *The Plant Cell* 16, 3020-3032.
- Molinari, M. 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation* 33, 261-274.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Oliveira, R. J., Ribeiro, L. R., Silva, A. F., Matuo, R., Mantovani, M.S. 2006. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicology in Vitro* 20, 1225-1233.

- Padilha, M. M. 2009. Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Alkaline Extracts from Mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). *Journal of Medicinal Food* 2 (2), 359-364.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30 (9), e36.
- Ramirez, T., Longato, L., Dostalek, M., Tong, M., Wands, J. R., De La Monte, S. M. 2013. Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol and Alcoholism: Oxford Journals* 48 (1), 39 - 52.
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J. L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 3 (7), 1125-1131.
- Rezaei, P. F., Fouladdel, S., Ghaffari, S. M., Amin, G. Azizi, E. 2012. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 20 (101), 1 - 5.
- Ruijter, J. M., Pfaffl, M.W., Zhao, S., Spiess, A. N., Boggy, G., Blom, J., Rutledge, R. G., Sisti, D., Lievens, A., De Preter, K., Derveaux, S., Hellemans, J., Vandesompele, J. 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods* 59 (1), 32-46.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., Moorman, A. F. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nuclei acids research* 37 (6), e45.
- Silva, A. F., Sartori, D., Macedo, F.C. Jr., Ribeiro, L. R., Fungaro, M. H., Mantovani, M. S. 2013. Effects of b-glucan extracted from *Agaricus blazei* on the expression of ERCC5, CASP9, and CYP1A1 genes and metabolic profile in HepG2 cells. *Human and Experimental Toxicology* 32 (6), 647-654.
- Singh, N.P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Slameňová, D., Lábaj, J., Krizková, L., Kogan, G., Sandula, J., Bresgen, N., Eckl, P. 2003. Protective effects of fungal (1→3)-β-d-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Letters* 198, 153-160.
- Someya, S., Xu, J., Kondo, K., Ding, D., Salvi, R. J., Yamasoba, T., Rabinovitch, P. S., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Prolla, T. A. 2009. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (46), 19432-19437.
- Sonck, E., Stuyven, E., Goddeeris, B., Cox, E. 2010. The effect of β-glucans on porcine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135, 199-207.
- Szczylik, C., Skorski, T., Nicolaides, N. C., Manzella, L., Malaguarnera, L., Venturelli, D., Gewirtz, A. M., Calabretta, B. 1991. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 253 (5019), 562 - 565.

Vaucher, R. A., Teixeira, M. L., Brandelli, A. 2010. Investigation of the Cytotoxicity of Antimicrobial Peptide P40 on Eukaryotic Cells. *Current Microbiology* 60, 1-5.

World Health Organization: Latest world cancer statistics. Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. 2013.

Zhang, M., Cheung, P. C. K., Chiu, L. C. M., Wong, E. Y. L., Ooi, V. E. C. 2006a. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuberregium*. *Carbohydrate Polymers* 66, 455-462.

Zhang, M., Chiu, L. C., Cheung, P. C., Ooi, V. E. 2006b. Growth-inhibitory effects of a β -glucan from the mycelium of *Poria cocos* on human breast carcinoma MCF-7 cells: Cell-cycle arrest and apoptosis induction. *Oncology Reports* 15, 637-643.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As β -glucanas tem apresentado diversos fatores importante à saúde humana. *In vitro*, tem demonstrado efeitos antigenotóxicos, antimutagênicos e anticlastogênicas entre outros. *In vivo*, tem demonstrado efeitos antimutagênicos, imunomoduladores, proteção contra infecções bacterianas, ativadora do sistema imune e tem efeitos benéficos quando administrado como adjuvante a terapias aumentando sua eficiência e diminuindo seus efeitos colaterais. Estas e outras propriedades de β -glucanas chamaram a atenção da indústria química e pesquisadores para modificações e busca de novos potenciais a estas moléculas. A insolubilidade em meio aquoso era um obstáculo para sua utilização clínica e a sulfatação torna esta molécula consideravelmente mais solúvel. Artigos têm demonstrado que a sulfatação também traz novos efeitos tais como inibição de vírus da dengue e potencialização de efeitos como anticoagulante, antitumoral entre outras.

No presente estudo, foi avaliado a viabilidade celular, genotoxicidade, cinética de proliferação e expressão de genes relacionados ao ciclo celular, apoptose, danos ao DNA, estresse e metabolismo. Os resultados obtidos sugerem que ambas as formas de β -glucanas interferem no metabolismo mitocondrial sendo que β -glucanas sulfatadas apresentam maior toxicidade e potência de ação. Quando estudado a viabilidade celular através da incorporação do Vermelho Neutro, os resultados demonstram que não há interferência de viabilidade por parte de β -glucanas não sulfatadas, entretanto há interferência após 24 horas por parte de β -glucanas sulfatadas, novamente demonstrando a maior potência de ação. Nos estudos associados no MTT (metabolismo), as β -glucanas sulfatadas apresentaram interferência significativa nos efeitos dos indutores de danos. Quando estudado a cinética de proliferação celular, apenas a concentração mais alta de β -glucanas sulfatadas em 72 horas apresentou inibição significativa de proliferação. Os dados de expressão gênica sugerem que, primeiramente, existe diferença na modulação de expressão de genes entre as duas formas de β -glucanas e que nas condições estudadas, ambas formas de β -glucanas, principalmente as sulfatadas não interferem no ciclo celular, não causam danos no DNA ou estresse considerável e não há indução de apoptose sendo um pondo negativo, uma vez que foi utilizado em linhagem tumoral.

A análise de expressão gênica demonstrou que β -glucanas sulfatadas modulam a expressão de genes que não são modulados significativamente por β -glucanas não sulfatadas, o que demonstra a maior potência de resposta de β -glucanas sulfatadas. Porém, a utilização de dose baixa e tempo curto são insuficientes para a compreensão satisfatória de mecanismos

moleculares. Para maior compreensão dos mecanismos moleculares utilizados por ambas formas de β -glucanas, é importante novos estudos com doses e tempos de tratamentos diferentes.

REFERÊNCIAS

- AKRAMIENE, D. et al. 2007. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*. v. 43 (8) p. 597-606.
- AKRAMIENE, D. et al. 2010. Potentiating effect of β -glucans on photodynamic therapy of implanted cancer cells in mice. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. v. 220, n. 4, p. 299-306.
- ALMEIDA, V. L. et al. 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. v. 28, n.1, p. 118-129.
- ALVES, M. G. C. F. et al. 2012. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology*. v. 24, p. 1217-1227.
- ANGELI, J. P. F. et al. 2009a. β -Glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. *Archives of Toxicology*. v. 83, p. 81-86.
- ANGELI, J. P. F. et al. 2009b. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and β -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 22, p. 699-703.
- BATBAYAR, S.; LEE, D. H.; KIM, H. W. 2012. Immunomodulation of Fungal β -Glucan in Host Defense Signaling by Dectin-1. *Biomolecules & Therapeutics*. v. 20, n. 5, p. 433-445.
- BELLINI, M. F. et al. 2003. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in Vitro*. v. 17, n. 4, p. 465-469.
- BELLINI, M.F. et al. 2006. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology in Vitro*. v. 20, p. 355-360.
- BERNAS, T. & DOBRUCKI, J. 2002. Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. *Cytometry*. v. 47, p. 236-242.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. v. 11, p. 127-152.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. 1993. Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives Biochemistry Biophysics*. v. 303, p. 474-482.

- BILAL, T. et al. 2012. Effect of Dietary β -Glucan on Serum Lipids and Performance Indices in Rats Fed a Diet Enriched with Cholesterol. *Pakistan Veterinary Journal*. v. 32, n. 1, p. 97-100.
- CAIPANG, C. M. A. et al. 2012. Transcription of selected immune-related genes in spleen cells of cod, *Gadus morhua* following incubation with alginic acid and β -glucan. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. v. 416, n. 417, p. 202-207.
- CHAN, G. C.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. 2009. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*. v. 2, p. 25.
- CHANG, Y. J. et al. 2006. Structural and Biological Characterization of Sulfated-Derivatized Oat β -Glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.54, p. 3815-3818.
- CHEN, J. & SEVIOUR, R. 2007. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- glucans. *Mycological Research*. v. 111, n. 6, p. 635-652.
- CHORVATOVIČOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; ŠANDULA, J. 1998. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration. *Mutation Research*. v. 412, p. 83-89.
- DIAS, M. A. et al. 2003. Estudo de um modelo animal de hipoplasia sanguínea induzida pelo agente antineoplásico doxorubicina (adriblastina®). *Ars Veterinaria*. V. 19, n. 3, P. 246-253.
- DMITRIEVA, N. I. & BURG, M. B. 2005. Hypertonic stress response. *Mutation Research*. v. 569, n. 1-2, p. 65-74.
- FELIPPE, J. R. 1999. AGARICUS – Cogumelo brasileiro com alguns efeitos anti-câncer. *Journal of Biomolecular Medicine e Free Radicals*. v. 5 n. 2, p. 36-37.
- FURGASON, J. M.; BAHASSI, EL, M. 2013. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 137, n. 3, p. 298 - 308.
- GALLUZZI, L.; KEPP, O.; TROJEL-HANSEN, C.; KROEMER, G. 2013. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Reports*. v. 13, n. 4, p. 322-330.
- GAMEIRO, P. H. et al. 2013. Antimutagenic Effect of Aqueous Extract from *Agaricus brasiliensis* on Culture of Human Lymphocytes. *Journal of Medicinal Food*. v. 16, n. 2, p. 180-183.
- GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; XIONG, Y.; HOLTZMAN, E. J. 2013. Gadd45 stress sensors in preeclampsia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 793, p. 121-129.
- GRAUBAUM, H. J. et al. 2012. A double-blind, randomized, placebo-controlled nutritional study using an insoluble yeast β -glucan to improve the immune defense system. *Food and Nutrition Sciences*. v. 3, p. 738-746.
- GUTERRES, Z. DA R. et al. 2005. Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology*. v. 28, n. 3, p. 458-463.
- HAN, M. D. et al. 2008. Solubilization of water-insoluble β -glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Environmental Biology*. v. 29, n. 2, p. 237-242.

- HOLCK, P. et al. 2007. Publishing Ltd Potentiation of Histamine Release by Microfungal (1→3)- and (1→6)-β-D-Glucans. *Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. v. 101 p. 455-458.
- HONDA, A. et al. 2012. An intron-retaining splice variant of human cyclin A2, expressed in adult differentiated tissues, induces a G1/S cell cycle arrest in vitro. *PLoS One*. v. 7, n. 6, p. 1 - 7.
- HONG, F. et al. 2004. Mechanism by which orally administered β-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *Journal of Immunology*. v. 173, p. 797-806.
- ICHIYAMA, K. et al. 2013. Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: a possible candidate for clinical application. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v. 7, n. 4, p. 1-17.
- JAVELAUD, D. & BESANCON, F. 2002. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n. 40, p. 37949 - 37954.
- JURCZYŃSKA, E. et al. 2012. [Beta-glucan as a natural anticancer agent]. *Polski Merkurusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. v. 33, n. 196, p. 217-220.
- KAUR, R. et al. 2010. Activation of p21-activated kinase 6 by MAP kinase kinase 6 and p38 MAP kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 280, n. 5, p. 3323 - 3330.
- KIM, M. et al. 2009. β-Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. *Nutrition Research and Practice*. v. 3, n. 3, p. 180-184.
- KIM, Y. H. et al. 2012. Single dose toxicity studies of sulfated water soluble beta-D-glucan in Sprague-Dawley rats. *Journal of Environmental Biology*. v. 33, n. 6, p. 1107-1114.
- KOFUJI, K. et al. 2012. Antioxidant Activity of β-Glucan. ISRN Pharmaceutics Id 125864.
- KUBOTA, T.; MYUNG, K.; DONALDSON, A. D. 2013. Is PCNA unloading the central function of the Elg1/ATAD5 replication factor C-like complex?. *Cell Cycle*. v. 12, n. 16, p. 2570 - 2579.
- KUMAGAI, Y. et al. 2013. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. In Press.
- MAGNANI, M. & GÓMEZ, R. J. H. C. 2008. β-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 29, n. 3, p. 631-650.
- MANTOVANI, M. S. et al. 2008. Beta-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*. v. 658, n. 3, p. 154-161.
- MELIS, J. P.; VAN STEEG, H.; LUIJTEN, M. 2013. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxidants & Redox Signaling*. v. 18, n. 18, p. 2409 - 2419.
- MÉNARD, R. 2004. β-1,3 Glucan Sulfate, but Not β-1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. *The Plant Cell*. v. 16, p. 3020-3032.

- MIADOKOVÁ, E. et al. 2005. The role of natural biopolymers in genotoxicity of mutagens/Carcinogens elimination. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*. v. 149, p. 493-496.
- MOLINARI, M. 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*. v. 33, p. 261-274.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*. v. 65 p. 55-63.
- MULLINS, J. T. (1990) Regulatory mechanism of β -glucan synthetases in bacteria, fungi and plants. *Physiological Plantarum*. v. 78, n. 2, p. 309-314.
- OLIVEIRA, J. M. et al. 2002. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. v. 40, p. 1775-1780.
- OLIVEIRA, R. J. et al. 2006. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicology in Vitro*. v. 20, p. 1225-1233.
- OLIVEIRA, R. J. et al. 2009. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 53 P. 164-173.
- PADILHA, M. M. 2009. Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Alkaline Extracts from Mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). *Journal of Medicinal Food*. v. 2, n. 2, p. 359-364.
- PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. v. 30, n. 9, e36.
- QUEENAN, K. M. et al. 2007. Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*. v. 6, p. 6.
- RAMIREZ, T. et al. 2013. Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol and Alcoholism: Oxford Journals*. v. 48, n. 1, p. 39 - 52.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. v. 3, n. 7, p. 1125-1131.
- REZAEI, P. F. et al. 2012. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 20, n. 101, 1 - 5.
- RODRIGUES, S. B. et al. 2003. Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema methG1 em *Aspergillus* (=Emericella) nidulans. *Acta Scientiarum. Agronomy*. v. 25, n. 2, p. 513-517.

- RUIJTER, J. M. et al. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*. v. 37, n. 6, e45.
- RUIJTER, J. M. et al. 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*. v. 59, n. 1, p. 32-46.
- SAKAMOTO, J. et al. 2006. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *Cancer Immunol Immunother*. v. 55, p. 404-411.
- ŞENER, G. et al. 2006. β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *European Journal of Pharmacology*. v. 542, p. 170-178.
- SILVA, A. F. et al. 2013. Effects of β -glucan extracted from *Agaricus blazei* on the expression of ERCC5, CASP9, and CYP1A1 genes and metabolic profile in HepG2 cells. *Human and Experimental Toxicology*. v. 32, n. 6, p. 647-654.
- SINGH, N.P. et al. 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*. v. 175 p. 184-191.
- SLAMEŇOVÁ, D. et al. 2003. Protective effects of fungal (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Letters*. v. 198, p. 153-160.
- SOARES, A. A. et al. 2013. Effects of an *Agaricus blazei* Aqueous Extract Pretreatment on Paracetamol-Induced Brain and Liver Injury in Rats. *BioMed Research International*. In press.
- SOMEYA, S. et al. 2009. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 106, n. 46, p. 19432-19437.
- SONCK, E. et al. 2010. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 135, p. 199-207.
- STEELE, C. et al. 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. Muris involves molecular recognition by the dectin-1 β -glucan receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. v. 198, n. 11, p. 1677-1688.
- STUYVEN, E. et al. 2009. Effect of β -glucans on an ETEC infection in piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 128, n. 1-3, p. 60-66.
- SZCZYLIK, C. et al. 1991. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science*. v. 253, n. 5019, p. 562 - 565.
- TSONI, S. V. & BROWN, G. D. 2008. β -glucans and dectin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 1143, p. 45-60.
- VAUCHER, R. A.; TEIXEIRA, M. L.; BRANDELLI, A. 2010. Investigation of the Cytotoxicity of Antimicrobial Peptide P40 on Eukaryotic Cells. *Current Microbiology*. v. 60, p. 1-5.

- WASSER, S. P. et al. 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill?. *International Journal Medical, Mushroom*. v.4, p. 267-290.
- WELKER, T. L. et al. 2012. Use of Diet Crossover to Determine the Effects of β -glucan Supplementation on Immunity and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. v. 43, n. 3, p. 335-348.
- WILLIAMS, D. L.; MUELLER, A.; BROWDER, W. 1996. Glucan-based macrophage stimulators. *Clinical Immunotherapy*. v. 5, p. 392-399.
- WOLEVER, M. S. T. et al. 2011. Bioactive oat β -glucan reduces LDL cholesterol in Caucasians and non-Caucasians. *Nutrition Journal*. v. 10, p. 130.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Latest world cancer statistics. Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. 2013.
- YAMADA, J. et al. 2007. Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine β -1,3 glucan: a randomized study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 119 p. 1119-1226.
- ZEKOVIĆ, D. B. et al. 2005. Natural and Modified (1 \rightarrow 3)- β -glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Review in Biotechnology*. v. 25 p. 205-230.
- ZHANG, M. et al. 2006a. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuberregium*. *Carbohydrate Polymers*. v. 66, p. 455-462.
- ZHANG, M. et al. 2006b. Growth-inhibitory effects of a β -glucan from the mycelium of *Poria cocos* on human breast carcinoma MCF-7 cells: Cell-cycle arrest and apoptosis induction. *Oncology Reports*. v. 15, p. 637-643.

APÊNDICES

Tabela 1 – Valores de absorvância em 540 nm (média \pm desvio padrão) para o tratamento com as diferentes concentrações (5 a 100 $\mu\text{g/mL}$) de β -Glucanas Sulfatadas e Não-Sulfatadas e os controles e controles DXR 1 μM no Ensaio do MTT em células MCF-7.

24 Horas	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Abs. Média	Desvio Padrão	Abs. Média	Desvio Padrão
Controle	1,026	\pm 0,075	1,011	\pm 0,057
5 $\mu\text{g/mL}$	0,852	\pm 0,048	0,943	\pm 0,050
10 $\mu\text{g/mL}$	0,741	\pm 0,041	0,819	\pm 0,040
15 $\mu\text{g/mL}$	0,644	\pm 0,048	0,776	\pm 0,050
25 $\mu\text{g/mL}$	0,588	\pm 0,043	0,757	\pm 0,048
50 $\mu\text{g/mL}$	0,473	\pm 0,047	0,718	\pm 0,045
75 $\mu\text{g/mL}$	0,382	\pm 0,036	0,618	\pm 0,044
100 $\mu\text{g/mL}$	0,407	\pm 0,039	0,609	\pm 0,050
DXR 1 μM	0,477	\pm 0,036	0,472	\pm 0,044

48 HORAS	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Abs. Média	Desvio Padrão	Abs. Média	Desvio Padrão
Controle	1,434	\pm 0,055	1,399	\pm 0,054
5 $\mu\text{g/mL}$	1,275	\pm 0,074	1,423	\pm 0,084
10 $\mu\text{g/mL}$	1,132	\pm 0,020	1,192	\pm 0,043
15 $\mu\text{g/mL}$	0,932	\pm 0,034	1,153	\pm 0,039
25 $\mu\text{g/mL}$	0,808	\pm 0,038	1,127	\pm 0,050
50 $\mu\text{g/mL}$	0,609	\pm 0,032	1,061	\pm 0,026
75 $\mu\text{g/mL}$	0,502	\pm 0,030	0,929	\pm 0,034
100 $\mu\text{g/mL}$	0,466	\pm 0,037	0,859	\pm 0,018
DXR 1 μM	0,363	\pm 0,011	0,357	\pm 0,038

72 HORAS	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Abs. Média	Desvio Padrão	Abs. Média	Desvio Padrão
Controle	1,845	\pm 0,206	1,940	\pm 0,098
5 $\mu\text{g/mL}$	1,673	\pm 0,073	2,018	\pm 0,069
10 $\mu\text{g/mL}$	1,517	\pm 0,078	1,599	\pm 0,057
15 $\mu\text{g/mL}$	1,324	\pm 0,055	1,676	\pm 0,061
25 $\mu\text{g/mL}$	1,105	\pm 0,037	1,631	\pm 0,079
50 $\mu\text{g/mL}$	0,878	\pm 0,068	1,554	\pm 0,074
75 $\mu\text{g/mL}$	0,670	\pm 0,110	1,440	\pm 0,118
100 $\mu\text{g/mL}$	0,726	\pm 0,024	1,331	\pm 0,080
DXR 1 μM	0,249	\pm 0,033	0,260	\pm 0,042

Tabela 2 – Valores de absorvância em 540 nm (média \pm desvio padrão) para o tratamento com duas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de β -Glucanas Sulfatadas e Não-Sulfatadas e estas concentrações associadas à doxorubicina (DXR 1 μM), juntamente com os controles e controles DXR 1 μM no Ensaio do MTT em células MCF-7.

24 Horas	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	1,123	\pm 0,111	1,123	\pm 0,111
50 $\mu\text{g/mL}$	0,574	\pm 0,094	0,841	\pm 0,010
50 $\mu\text{g/mL}$ +DXR 1 μM	0,306	\pm 0,041	0,421	\pm 0,078
DXR 1 μM	0,548	\pm 0,020	0,548	\pm 0,020
	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	1,134	\pm 0,050	1,134	\pm 0,050
100 $\mu\text{g/mL}$	0,507	\pm 0,017	0,642	\pm 0,078
100 $\mu\text{g/mL}$ +DXR 1 μM	0,290	\pm 0,041	0,444	\pm 0,007
DXR 1 μM	0,548	\pm 0,010	0,687	\pm 0,010

Tabela 3 – Valores de absorvância em 540 nm (média \pm desvio padrão) para o tratamento com as diferentes concentrações de β -Glucanas Sulfatadas e Não-Sulfatadas nas concentrações de 5, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ e a associação da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ + DXR 0,5 μM , e os controles e controle DXR 0,5 μM no Ensaio do Vermelho Neutro em células MCF-7.

24 Horas	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Abs. Média	Desvio Padrão	Abs. Média	Desvio Padrão
Controle	0,904	\pm 0,042	0,904	\pm 0,042
5 $\mu\text{g/mL}$	0,957	\pm 0,022	0,895	\pm 0,050
50 $\mu\text{g/mL}$	0,845	\pm 0,031	0,876	\pm 0,053
100 $\mu\text{g/mL}$	0,854	\pm 0,020	0,876	\pm 0,036
100 $\mu\text{g/mL}$ +DXR 0,5 μM	0,700	\pm 0,036	0,648	\pm 0,076
DXR 0,5 μM	0,657	\pm 0,027	0,657	\pm 0,027

48 HORAS	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Abs. Média	Desvio Padrão	Abs. Média	Desvio Padrão
Controle	0,318	\pm 0,025	0,318	\pm 0,025
5 $\mu\text{g/mL}$	0,312	\pm 0,029	0,300	\pm 0,055
50 $\mu\text{g/mL}$	0,314	\pm 0,028	0,302	\pm 0,026
100 $\mu\text{g/mL}$	0,304	\pm 0,033	0,302	\pm 0,035
100 $\mu\text{g/mL}$ +DXR 0,5 μM	0,149	\pm 0,030	0,152	\pm 0,054
DXR 0,5 μM	0,164	\pm 0,053	0,164	\pm 0,053

72 HORAS	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Abs. Média	Desvio Padrão	Abs. Média	Desvio Padrão
Controle	0,409	\pm 0,013	0,409	\pm 0,013
5 $\mu\text{g/mL}$	0,407	\pm 0,031	0,411	\pm 0,040
50 $\mu\text{g/mL}$	0,391	\pm 0,032	0,402	\pm 0,039
100 $\mu\text{g/mL}$	0,377	\pm 0,011	0,385	\pm 0,013
100 $\mu\text{g/mL}$ +DXR 0,5 μM	0,089	\pm 0,052	0,039	\pm 0,024
DXR 0,5 μM	0,080	\pm 0,041	0,080	\pm 0,041

Tabela 4 – Valores de absorvância em 414 nm (média \pm desvio padrão) para o tratamento com as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -Glucanas Sulfatadas e Não-Sulfatadas, o controle e controle positivo (lise com Triton 2 $\mu\text{l/mL}$) em eritrócitos no Ensaio de Hemólise.

24 Horas	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	0,190	\pm 0,013	0,190	\pm 0,013
25 $\mu\text{g/mL}$	0,215	\pm 0,010	0,179	\pm 0,003
50 $\mu\text{g/mL}$	0,210	\pm 0,007	0,185	\pm 0,010
100 $\mu\text{g/mL}$	0,217	\pm 0,008	0,194	\pm 0,007
Triton 2 $\mu\text{l/mL}$	8,660	\pm 0,376	8,660	\pm 0,376

Tabela 5 – Valores de *score* (média \pm Desvio Padrão) após três horas de tratamento com as concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -Glucanas Sulfatadas e Não-Sulfatadas e a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ associado a DXR 1 μM , juntamente com os controles e controles DXR1 μM em células MCF-7 no Ensaio do Cometa.

3 Horas	β -Glucanas Sulfatadas		β -Glucanas Não-Sulfatadas	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	18,00	\pm 1,732	16,333	\pm 5,033
5 $\mu\text{g/mL}$	17,33	\pm 2,309	19,333	\pm 1,154
50 $\mu\text{g/mL}$	20,33	\pm 7,637	17,333	\pm 5,859
100 $\mu\text{g/mL}$	28,33	\pm 4,932	15,333	\pm 4,725
100 $\mu\text{g/mL}$ + DXR 1 μM	97,00	\pm 7,810	101,00	\pm 1,732
DXR 1 μM	112	\pm 6	111,00	\pm 6,082

Tabela 6 – Valores normalizados de impedância para ambas formas de β -Glucanas nas concentrações de 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ tendo a mais alta também associada a doxorrubicina 0,5 μM e os controles e controles DXR 0,5 μM no Ensaio do proliferação em tempo real (RTCA). O quadro representa leitura de cada 6 horas. Após o tratamento, o índice celular foi normalizado. (Leitura foi realizada a cada 30 minutos durante 96 horas) em células MCF-7.

Tempo(hh:mm:ss)	β -Glucanas Sulfatadas				β -Glucanas Não-Sulfatadas				Controles	
	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$ + Dxr 0,5 μM	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$ + Dxr 0,5 μM	Controle	DXR 0,5 μM
00:00:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
00:00:12	-0,001	0,0002	0,0016	-0,0014	0	0,0008	0,0009	0,0001	0,0012	0,0017
06:11:17	0,3824	0,3777	0,3982	0,3912	0,3863	0,3885	0,3937	0,3984	0,4135	0,4118
12:11:19	0,5991	0,5866	0,6101	0,6047	0,6035	0,6055	0,6016	0,6143	0,6236	0,6264
18:11:23	0,7864	0,7739	0,8006	0,7992	0,7986	0,7942	0,786	0,8071	0,8113	0,8131
24:41:28	1,022	1,0019	1,0238	1,0303	1,0275	1,0181	1,0135	1,0392	1,0464	1,0485
Tratamento										
Índice Normalizado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30:52:40	1,2467	1,3165	1,2706	1,3034	1,1881	1,1711	1,1369	1,1416	1,204	1,2114
36:53:00	1,5269	1,6202	1,5564	1,42	1,4705	1,4255	1,3686	1,2407	1,4844	1,3524
42:53:22	1,8763	1,9703	1,8698	1,3117	1,8239	1,7529	1,671	1,2315	1,8257	1,3301
48:52:58	2,294	2,3859	2,2582	1,0244	2,2199	2,1595	2,0367	1,0901	2,2394	1,1845
54:53:18	2,7894	2,842	2,656	0,5168	2,6843	2,6777	2,4897	0,7021	2,7282	0,7788
60:53:34	3,4063	3,4006	3,1297	0,1613	3,2378	3,3224	3,0542	0,326	3,3321	0,3703
66:53:56	4,1943	4,1304	3,7339	-0,0117	3,9482	4,1473	3,7878	0,0882	4,1053	0,1108
72:54:12	5,1466	5,0927	4,5107	-0,0896	4,8764	5,1631	4,7384	-0,0292	5,084	-0,0191
78:54:36	6,2989	6,2084	5,4673	-0,1241	5,976	6,3365	5,8428	-0,0847	6,2369	-0,0798
84:54:48	7,5974	7,4808	6,6352	-0,141	7,2301	7,7271	7,0969	-0,1111	7,6203	-0,1096
90:54:50	9,0213	8,9712	8,0369	-0,1513	8,7251	9,2815	8,4239	-0,1266	9,2089	-0,1267
96:55:06	10,5875	10,5905	9,4543	-0,1612	10,413	10,9173	9,8284	-0,1377	10,9051	-0,1359
102:54:30	11,9952	12,138	10,7483	-0,1659	12,2965	12,5049	11,2056	-0,1473	12,4223	-0,1513
108:54:32	12,8095	13,0391	11,5168	-0,1697	13,3848	13,3068	11,9013	-0,1513	13,0392	-0,1577
114:54:40	13,2858	13,5696	12,1427	-0,1736	14,014	13,6794	12,3294	-0,1559	13,2638	-0,1651
120:24:54	13,4704	13,9121	12,6632	-0,1762	14,1924	13,82	12,5399	-0,1581	13,322	-0,1639

Quadro 1 – Resultados do RTq-PCR em tempo real dos genes estudados em células MCF-7 quando tratadas com 5 µg/mL de β-Glucanas sulfatadas e não sulfatadas durante 6 horas.

Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2	1,963	1,981			
	Cq	24,82	25,19		-0,37	0,77652	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,724519
	Cq	17,46	17,56		0,10	1,071773	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BAX</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	24,82	25,17		-0,35	0,7845841	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,98	1,99			0,9191274
	Cq	17,46	17,69		-0,23	0,8536184	
Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	2	1,967	1,983			
	Cq	25,78	27,70		-1,92	0,2686213	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,287901
	Cq	17,46	17,56		-0,10	0,933033	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BAK</i>	Eficiência	1,935	1,89	1,912			
	Cq	25,78	26,27		-0,49	0,7278987	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,98	1,99			0,852721
	Cq	17,46	17,69		-0,23	0,8536184	
Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	2	1,9	1,95			
	Cq	29,87	30,44		-0,57	0,6834083	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,732459
	Cq	17,46	17,56		-0,10	0,933033	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BCL-2</i>	Eficiência	2	1,997	1,998			
	Cq	29,87	29,92		-0,05	0,9659847	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,98	1,99			1,131635
	Cq	17,46	17,69		-0,23	0,8536184	
Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão

<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,861	1,976	1,918			
	Cq	26,06	27,47		-1,41	0,3991935	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,427845
	Cq	17,46	17,56		-0,10	0,933033	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>BCL-XL</i>	Eficiência	1,861	2	1,930			
	Cq	26,06	26,25		-0,19	0,8825597	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,98	1,99			1,033904
	Cq	17,46	17,69		-0,23	0,8536184	

Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>CASP-9</i>	Eficiência	1,8	1,858	1,829			
	Cq	29,08	29,72		-0,64	0,6794902	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,72826
	Cq	17,46	17,56		-0,10	0,933033	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>CASP-9</i>	Eficiência	1,8	2	1,9			
	Cq	29,08	29,24		-0,16	0,9024007	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,98	1,99			1,057148
	Cq	17,46	17,69		-0,23	0,8536184	

Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>GADD45A</i>	Eficiência	1,935	2	1,967			
	Cq	28,43	28,35		0,08	1,0556121	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,392888
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>GADD45A</i>	Eficiência	1,935	1,991	1,963			
	Cq	28,43	28,50		-0,07	0,953884	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,103346
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>GADD153</i>	Eficiência	1,897	2	1,948			
	Cq	26,40	26,26		0,14	1,0978486	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,44862
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	

Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>GADD153</i>	Eficiência	1,897	2	1,948			
	Cq	26,40	26,38		0,02	1,0134254	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			1,172217
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>P53</i>	Eficiência	1,917	1,979	1,948			
	Cq	22,32	23,61		-1,29	0,4230876	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			0,558267
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	

Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>P53</i>	Eficiência	1,917	2	1,958			
	Cq	22,32	22,63		-0,31	0,8119664	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			0,939192
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CHECK1</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	26,08	25,73		0,35	1,2745606	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			1,681793
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	

Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CHECK1</i>	Eficiência	2	1,956	1,978			
	Cq	26,08	25,81		0,27	1,2022121	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			1,390585
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CHECK2</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	25,56	25,87		-0,31	0,8066418	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			1,06437
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	

Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CHECK2</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	25,56	25,78		-0,22	0,8585654	

<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,993092
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>XPA</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	27,90	27,93		-0,03	0,9794203	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,292353
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>XPA</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	27,90	28,08		-0,18	0,882703	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,021012
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>PCNA</i>	Eficiência	2	1,991	1,995			
	Cq	23,14	23,27		-0,13	0,9141289	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,2062
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>PCNA</i>	Eficiência	2	1,986	1,993			
	Cq	23,14	23,17		-0,03	0,9795233	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,133003
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>ERCC5</i>	Eficiência	1,922	1,944	1,933			
	Cq	24,27	24,12		0,15	1,1039128	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,456622
	Cq	17,50	17,90		-0,40	0,7578583	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>ERCC5</i>	Eficiência	1,922	2	1,961			
	Cq	24,27	24,43		-0,16	0,8978496	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,038532
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>NFE2L2</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	28,67	29,29		-0,62	0,6506709	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			0,858565
	Cq	17,50	17,90		-0,4	0,7578583	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>NFE2L2</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	28,67	28,81		-0,14	0,9075192	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			1,049717
	Cq	17,50	17,71		-0,21	0,8645372	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>ABL1</i>	Eficiência	1,971	2	1,985			
	Cq	31,02	35,11		-4,09	0,0605563	
β -ACTINA	Eficiência	2	1,934	1,967			0,068398
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>ABL1</i>	Eficiência	1,971	2	1,985			
	Cq	31,02	32,38		-1,36	0,3935915	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			0,487938
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>ABL2</i>	Eficiência	2	1,953	1,976			
	Cq	28,36	29,03		-0,67	0,6336111	
β -ACTINA	Eficiência	2	1,934	1,967			0,715661
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>ABL2</i>	Eficiência	2	1,928	1,964			
	Cq	28,36	28,52		-0,16	0,89763	
β -ACTINA	Eficiência	2	2	2			1,112799
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>MAP2K6</i>	Eficiência	1,935	2	1,967			
	Cq	26,87	29,24		-2,37	0,2012258	

<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,934	1,967			0,227284
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>MAP2K6</i>	Eficiência	1,935	2	1,967			
	Cq	26,87	27,49		-0,62	0,6574176	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			0,815006
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	2	1,948	1,974			
	Cq	22,93	22,70		0,23	1,1693105	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,934	1,967			1,320732
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CCNA2</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	22,93	22,89		0,04	1,0281138	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,274561
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CCNB1</i>	Eficiência	2	1,98	1,99			
	Cq	21,29	21,39		-0,10	0,9335008	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,934	1,967			1,054386
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CCNB1</i>	Eficiência	2	2	2			
	Cq	21,29	21,17		0,12	1,0867349	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,347234
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β -Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β -G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão
<i>CCNE1</i>	Eficiência	1,922	2	1,961			
	Cq	26,82	26,94		-0,12	0,9223647	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,934	1,967			1,041807
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β -Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β -G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	$E^{\Delta Cq}$	Razão

<i>CCNE1</i>	Eficiência	1,922	2	1,961			
	Cq	26,82	26,87		-0,05	0,9668879	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,198658
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>CCND1</i>	Eficiência	2	1,892	1,946			
	Cq	23,32	24,04		-0,72	0,6191803	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,934	1,967			0,699362
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>CCND1</i>	Eficiência	2	1,903	1,951			
	Cq	23,32	23,60		-0,28	0,8293311	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,028128
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Controle x β-Glucanas Sulfatadas							
		Controle	β-G Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,907	1,953			
	Cq	16,96	17,41		-0,45	0,7399187	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	1,934	1,967			0,835735
	Cq	16,79	16,97		-0,18	0,8853505	
Controle x β-Glucanas Não-Sulfatadas							
		Controle	β-G Não-Sulf.	Eficiência Média	Delta Cq	E ^{ΔCq}	Razão
<i>GAPDH</i>	Eficiência	2	1,914	1,957			
	Cq	16,96	17,20		-0,24	0,8511737	
<i>β-ACTINA</i>	Eficiência	2	2	2			1,055207
	Cq	16,79	17,10		-0,31	0,8066418	

Figura 1 – Imagem representativa para avaliação da integridade do RNA, indicando o rRNA 28S e 18S. RNA total isolado de células MCF-7 após tratamento por 6 horas com ambas formas de β -Glucanas.

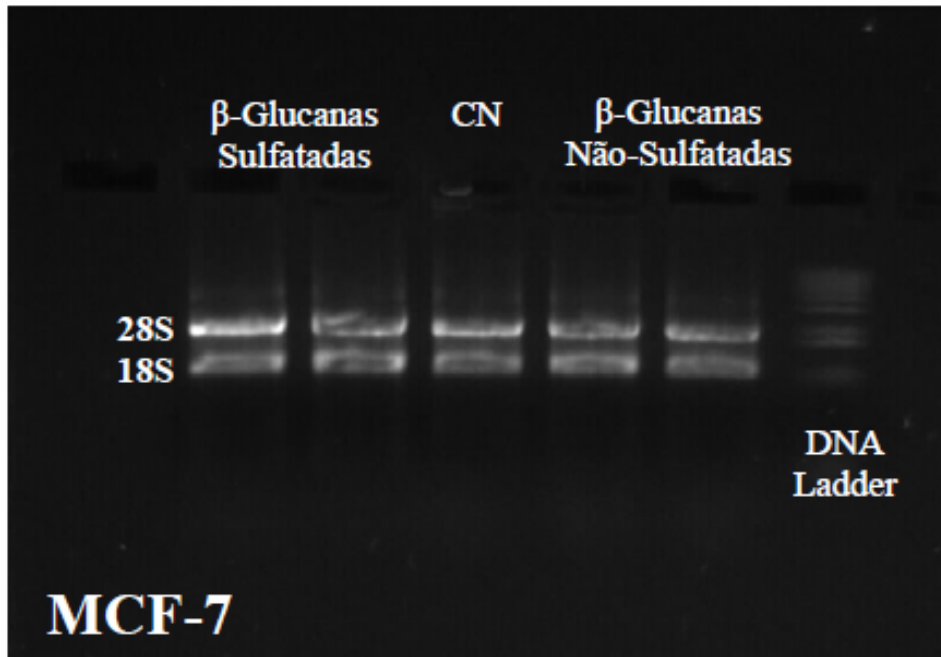
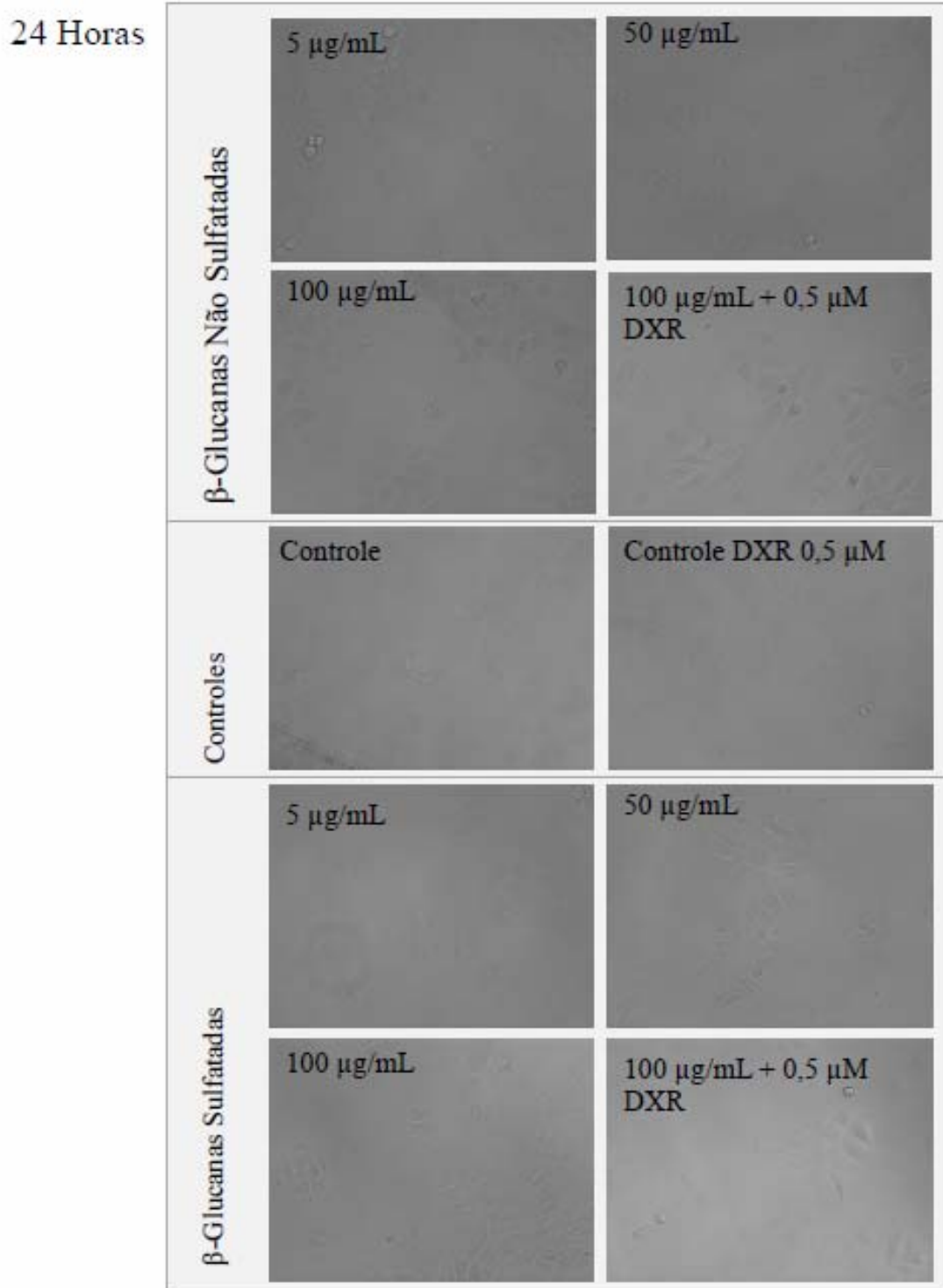


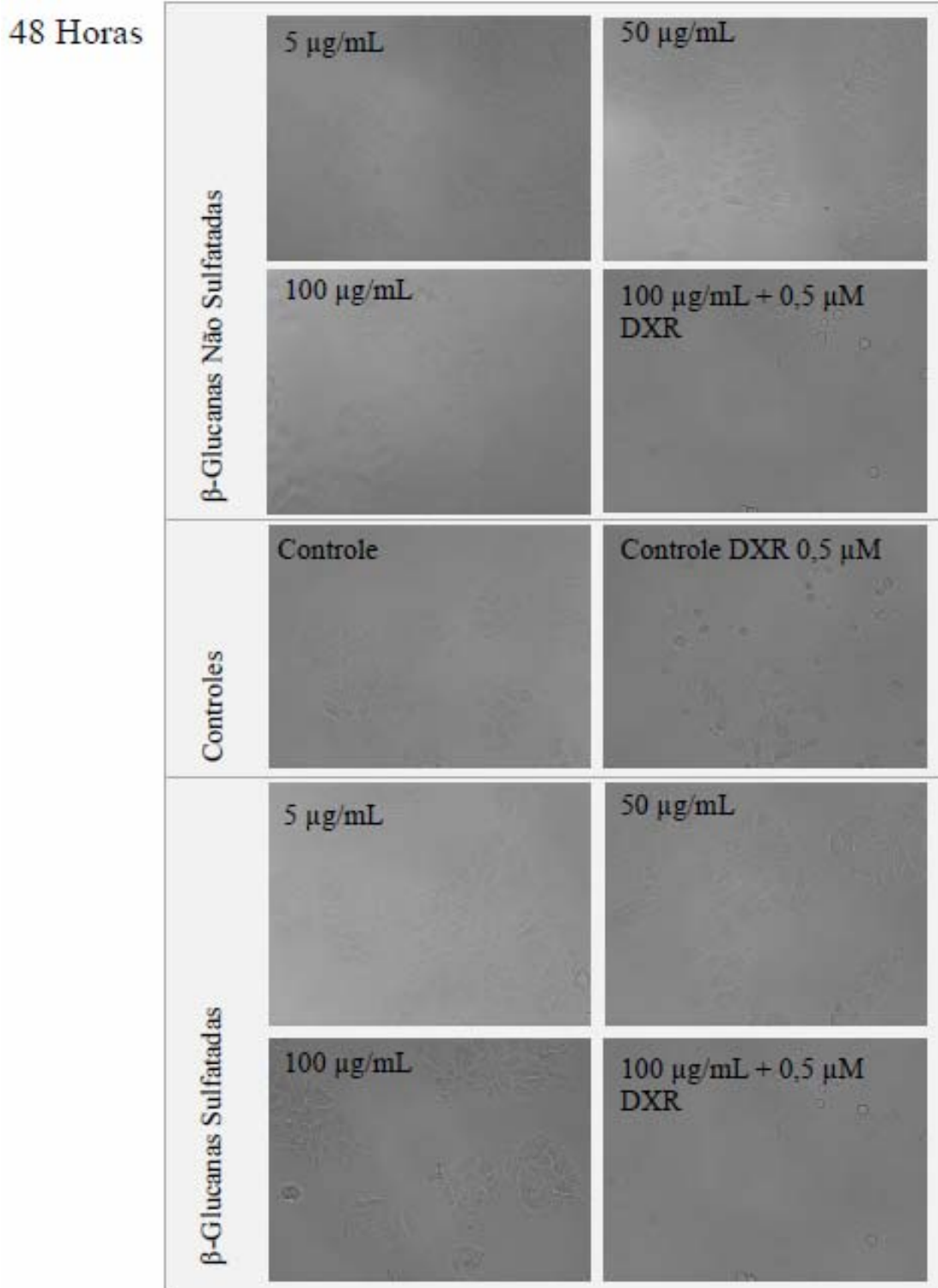
Tabela 7 – Quantificação de RNA por espectrofotômetro. Extração de RNA de células MCF-7, repetições 1, 2 e 3 para os tratamentos com ambas formas de β -Glucanas e o controle durante 6 horas de tratamentos.

	R1		R2		R3	
Tratamento	ng/uL	Razão	ng/uL	Razão	ng/uL	Razão
Controle	397,1	2.03	578,9	2.10	551,9	2,08
β -Glucanas Não Sulfatadas	426,1	2.03	576,8	2.08	557,7	2,08
β -Glucanas Sulfatadas	408,1	2.04	565,3	2.08	594,3	2,08

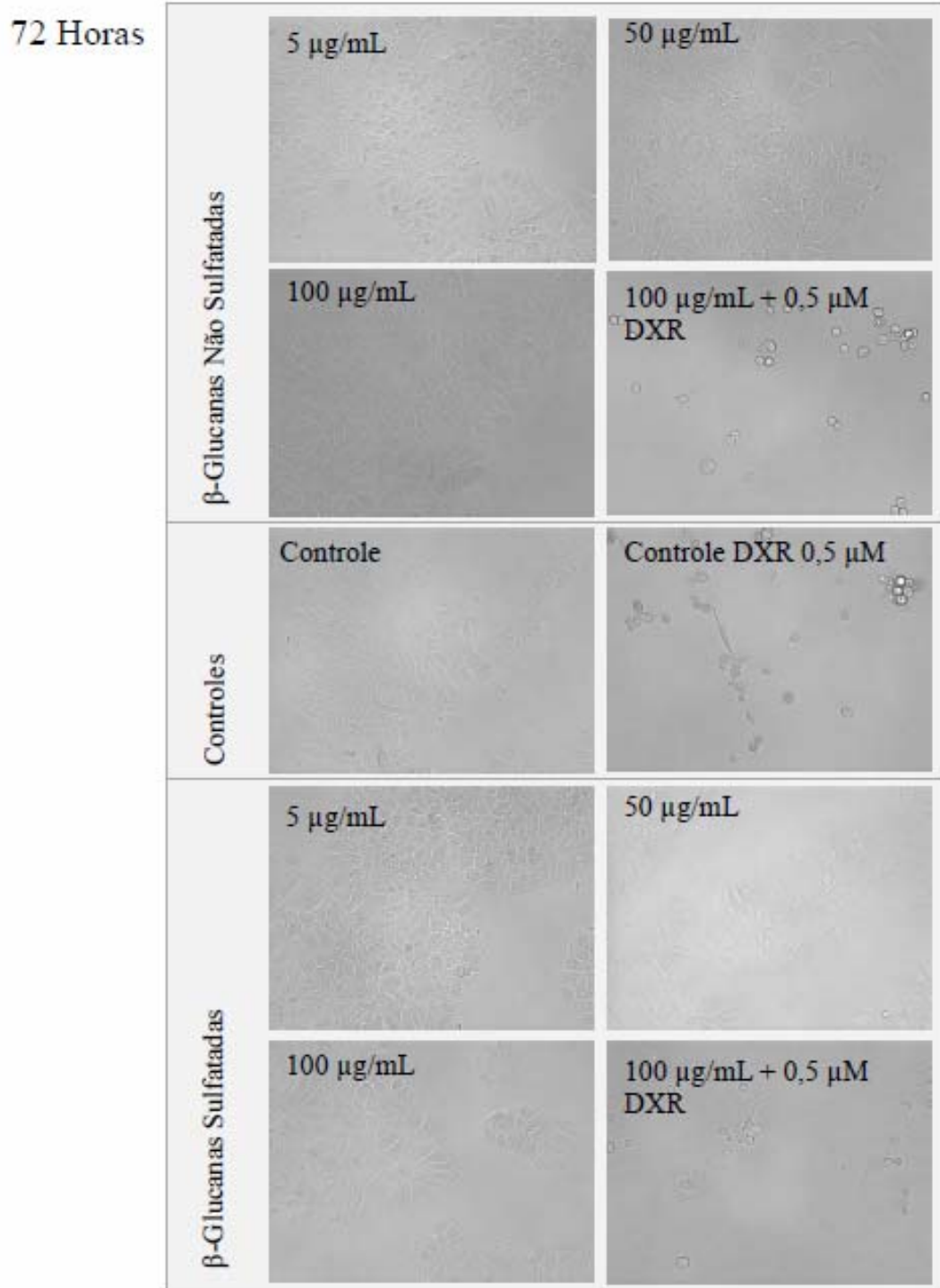
Quadro 2 – Micrografias de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações (5, 50 100 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ associado a DXR 0,5 μM) de ambas formas de β -Glucanas e os respectivos controle e controle DXR 0,5 μM por 24 horas de tratamento. Micrografias obtidas pelo aparelho *FLoid® Cell Imaging Station*.



Quadro 3 – Micrografias de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações (5, 50 100 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ associado a DXR 0,5 μM) de ambas formas de β -Glucanas e os respectivos controle e controle DXR 0,5 μM por 48 horas de tratamento. Micrografias obtidas pelo aparelho *FLoid® Cell Imaging Station*.



Quadro 4 – Micrografias de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações (5, 50 100 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ associado a DXR 0,5 μM) de ambas formas de β -Glucanas e os respectivos controle e controle DXR 0,5 μM por 72 horas de tratamento. Micrografias obtidas pelo aparelho *FLoid® Cell Imaging Station*.



ANEXOS

Figura 1 – Etapas do ensaio do Cometa. Da suspensão celular até a análise em microscopia de fluorescência, mostrando as quatro classes de danos ao DNA; 0, 1, 2 e 3.

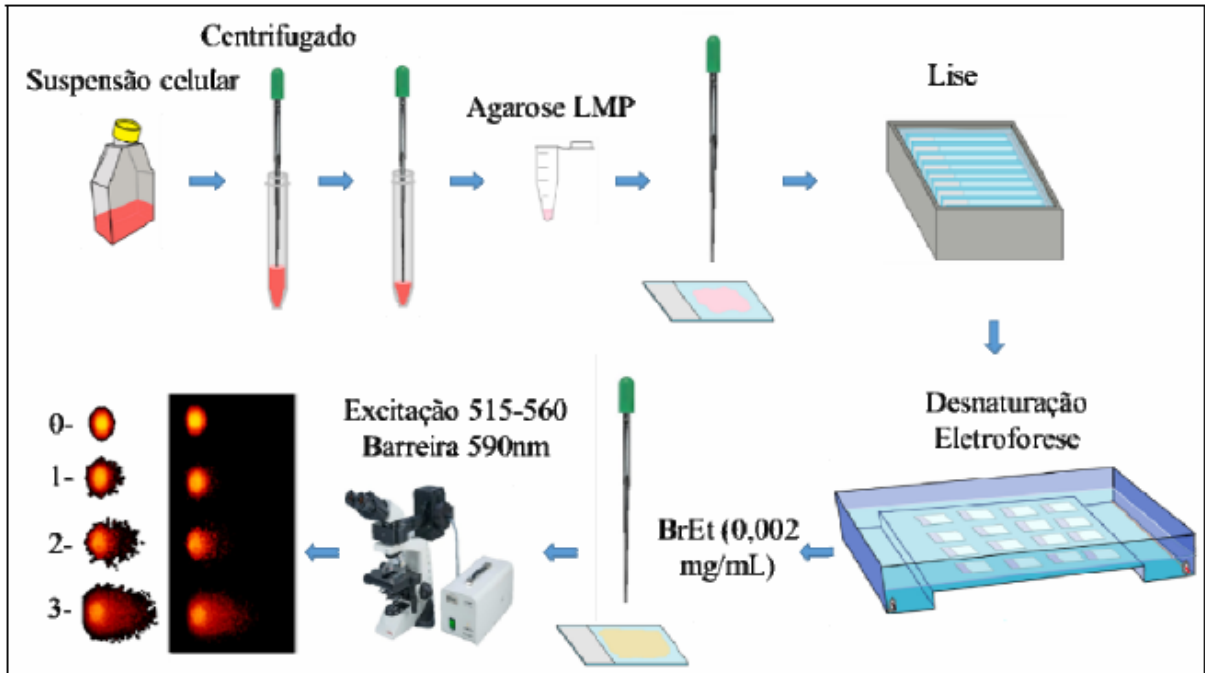


Figura 2 – As quatro classes de danos ao DNA; 0, 1, 2 e 3 no Ensaio do Cometa – Células MCF-7 deste trabalho.

