

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA
INSTITUTO AGRONOMICO DO PARANA

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENETICA E BIOLOGIA MOLECULAR

José Pedro Friedmann Angeli

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DE β -
GLUCANAS DE ORIGEM FÚNGICA E VEGETAL NO DNA
DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS”**

Londrina
2007

José Pedro Friedmann Angeli

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DE β -
GLUCANAS DE ORIGEM FÚNGICA E VEGETAL NO
DNA DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular da
Universidade Estadual de Londrina – UEL, como
requisito parcial à obtenção do título de mestre

Orientador: Prof^o. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina – PR
2007

JOSÉ PEDRO FRIEDMANN ANGELI

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO QUIMIOPROTETOR DE β -
GLUCANAS DE ORIGEM FÚNGICA E VEGETAL NO
DNA DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS”**

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori

UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllus Cólus

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Dedicatória

**Aos meus pais Zé Mario e Rose, por me incentivarem e apoiarem,
desde 17 de Setembro de 1983.**

Agradecimentos

Ao professor e amigo Dr. Mário Sergio Mantovani, pela orientação, paciência, broncas e acima de tudo por acreditar em mim desde a minha iniciação científica, me incentivando a continuar na vida acadêmica.

A professora Dra. Lucia Regina Ribeiro, pela orientação, amizade e por todos as portas que esta me abriu, ajudando a minha formação profissional.

A banca examinadora composta pelas professoras Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus e Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, pelas criticas e sugestões que ajudaram na melhoria deste trabalho.

A todo o pessoal do laboratório de Genética Toxicológica do Instituto do Câncer de Viena, por terem me aceitado e me auxiliado durante quase 2 meses, onde tive o privilegio de trabalhar com estes.

Aos professores Ana Lucia Dias, Leda M.K. Sodré, Josué Maldonado, Berenice Quinzani Jordão, Silvia Helena Sofia e Lucia Caetano pelos ensinamentos passados durante os dois anos de mestrado.

A coordena o do Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular.

Ao departamento de Biologia Geral da UEL.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e Fundação Araucária, sem as quais não teria sido possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos de Laboratório, Dario e Melissa pelos auxílios nos serviços laboratoriais.

Aos amigos de turma, especialmente ao Bruno “Caboclo” pelos mais de 5 anos de amizade, companheirismo, trapalhadas e todo tipo de robada que alguém pode se envolver!

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese in vitro e in vivo, que fizeram com que esses 2 anos fossem os mais agradáveis e marcantes possíveis, em especial agradeço ao amigo Gustavo por ter me ajudado sempre que precisei mesmo que a ajuda oferecida fosse em cerveja! Agradeço a Juliana Mara por ter agüentado minhas reclamações e dores de cotovelo e horas intermináveis de conversas na Internet... o que dificultou muito o termino desse trabalho! A Mariana também por esta paciência inesgotável, sempre pronta a ouvir as reclamações independente do horário e do dia! A Hellen pelas muitas conversas em Inglês durante os churrascos, onde aprendi que o Álcool ajuda e muito na fluência! A Iara pelos momentos divertidos proporcionados em todas as festas que fomos. Ao Fernando “Trovão” pelas poucas e boas dicas tanto a nível profissional como pessoal, e pelos momentos únicos proporcionados por este durante as aulas, e por ultimo a Marcela por ter agüentado minhas neuras, bagunças e qualquer tipo de transtorno, durante os quase dois anos em que moramos juntos em Viena!

Aos amigos que trago desde criança e outros mais recentes, Humberto, Gustavo, Luis Henrique, Diogo, Fellipe, Vinicius “Blequi” e Marcelo pelos ótimos, churrascos, cervejadas, formaturas fazendo com que todos os anos que ficaram para trás tivessem um sabor um significado que permearão comigo para sempre!

Ao meu irmão José Lourenço, pelos mais de 20 anos de brigas, desentendimentos mas que de alguma forma ajudaram a estreitar o nosso laço de amizade nos últimos anos.

Aos meus familiares, tios, tias, primos, primas, avôs e avós por cada um ter uma parcela na minha formação pessoal, e também por me fazerem entender que não a nada mais forte e importante que a Família.

Sumario

1) Introdução.....	1
1.1) Nutrição e Carcinogênese.....	1
1.2) Quimioprevenção.....	3
1.2.1) Classificação dos mecanismos de quimioprevenção.....	3
1.3) Beta-glucanas (BG).....	7
1.4) Ensaio de mutagênese e cultura celular.....	8
1.4.1) Teste de aberrações cromossômicas.....	9
1.4.2) Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese.....	11
1.4.3) Ensaio do cometa.....	12
2) Objetivos.....	14
2.1) Objetivos específicos	14
 ARTIGO 01 – Anticlastogenic effect of β -glucan from barley towards chemically induced DNA damage in rodent cells.....	15
ARTIGO 02 – Protective effect of β -glucan from <i>Agaricus brasiliensis</i> against chemically induced DNA damage in human lymphocytes.....	17
ARTIGO 03 – Redução do efeito genotóxico do benzo[a]pireno em células hepáticas (HepG2) tratadas com -glucana extraída de cevada.....	19
ARTIGO 04 - β -glucana extraída do cogumelo medicinal <i>Agaricus blazei</i> previne efeitos genotóxicos e mutagênicos causados pelo Benzo[a]pireno em linhagem celular hepática humana.....	40
ARTIGO 05 - Avaliação do efeito genotóxico e/ou antígenotóxico de polissacarídeos extraídos de diferentes fases do desenvolvimento do cogumelo medicinal <i>Agaricus brasiliensis</i>	63
Considerações finais.....	81
Referencias bibliográficas.....	82
Anexo1.....	89
Anexo2.....	96

RESUMO

As β -glucanas são polissacarídeos extraídos da parede celular de diversos organismos. Composto este que atraiu a atenção devido a suas propriedades medicinais. O objetivo do presente estudo foi de testar o efeito genotóxico e ou antígenotóxico de BG extraídas de *Agaricus blazei* e cevada, contra agentes genotóxicos diretos (Metil metanosulfonato -MMS, Ara-C, BPDE, H_2O_2 , Bleomicina, Doxorubicina) e indiretos (Trp-p-2, Benzo[a]pireno – B[a]P, 2-aminoantraceno - 2AA), através do ensaio do cometa, micronúcleo (*somente a BG de Agaricus blazei*) e aberrações cromossômicas (*somente cevada*). Também foram realizados diferentes tipos de tratamento para obtermos informações sobre os possíveis mecanismos de ação da BG. Os resultados demonstrados no primeiro trabalho mostraram que a BG de cevada apresentou eficiente redução dos danos causados pelo MMS, 2-AA e Ara-C nas linhagens HTC e CHO-k1 avaliadas pelo teste de aberrações cromossômicas. No segundo trabalho, mostrou-se através do teste do cometa que a BG de *Agaricus blazei* reduziu os danos causados pelo Trp-p-2, H_2O_2 porém não do BPDE em linfócitos humanos. O terceiro trabalho avaliou pelo teste do cometa que a BG de cevada reduziu na linhagem HepG2 os danos causados pelo B[a]P em diferentes fases de tratamento. No quarto trabalho, ficou demonstrado pelo teste do cometa e do micronúcleo que a BG de *Agaricus* reduziu eficientemente a migração de DNA e a formação de micronúcleos induzidos pelo B[a]P em diferentes protocolos de tratamento na linhagem HepG2, por ultimo no quinto trabalho foi evidenciado que polissacarídeos de parede de *Agaricus* e BG extraídas dos mesmos apresentaram efeito protetor contra os danos induzidos pela bleomicina, doxorubicina, e H_2O_2 , efeito protetor que aumenta conforme a maturação do cogumelo.

Desta maneira, sugere-se que a BG é um eficiente protetor do material genético, protegendo o DNA de células tratadas com diversos compostos mutagenicos, protegendo principalmente por um mecanismo de desmutagênese, entretanto resultados obtidos nos nossos estudos não permitam a exclusão de um mecanismo de bio-antimutagenese. Isso tudo possibilita em um futuro próximo a adição de BG na alimentação para o seu uso como um agente quimiopreventivo, entretanto para isso mais estudos precisam ser realizados.

Abstract

β -glucans are polysaccharides extracted of the cellular wall of several organisms. Composed this that attracted the attention due to their medicinal properties. The objective of the present study was to test the genotoxic and/or antigenotoxic effect of BG extracted of *Agaricus blazei* and barley, against agents direct genotóxicos (Methyl methanesulfonate -MMS, Ara-C, BPDE, H₂O₂, Bleomycin, Doxorubicin) and indirect (Trp-p-2, Benzo[a]pireno - B[a]P, 2-aminoanthracen - 2AA), through the comet assay, micronuclei (only the BG of *Agaricus blazei*) and chromosomal aberration (only barley). Also different treatment types were accomplished for us to obtain information on the possible mechanisms of action of BG. The results demonstrated in the first work showed that barley BG presented efficient reduction of the damages caused by MMS, 2-AA and Ara-C in the lineages HTC and CHO-k1 for the chromosomal aberrations. In the second work, it was shown through the comet assay that BG of *Agaricus blazei* reduced the damages caused by Trp-p-2, H₂O₂ but not of BPDE in human lymphocytes. The third work evaluated by the comet assay that barley BG reduced in the lineage HepG2 the damages caused by B[a]P in different treatment phases. In the fourth work, it was demonstrated by the comet and micronucleus assay that BG of *Agaricus* reduced the migration of DNA and the micronúcleos formation efficiently induced by B[a]P in different treatment protocols in the lineage HepG2, for last, in the fifth work was evidenced that polysaccharides of wall of *Agaricus* and BG extracted of the same ones presented protecting effect against the damages induced by the bleomicina, doxorubicina, and H₂O₂, protecting effect that it increases according to the maturation of the mushroom.

Of this it sorts things out, he/she suggests himself that BG is an efficient protector of the genetic material, protecting DNA of cells treated with composed several mutagenicos, protecting mainly for a desmutagênese mechanism, however results obtained in our studies don't allow the exclusion of a bio-antimutagenese mechanism. That everything makes possible in a close future the addition of BG in the feeding for his/her use as an agent quimiopreventivo, meantime for that more studies need to be accomplished.

1. Introdução

O Século XX e início do século XXI têm sido caracterizados por um significativo aumento na expectativa de vida e por uma revolução nas principais causas de morte de sua população (DE FLORA et al., 2005). Durante séculos a população humana fora dizimada nos primeiros anos de vida por infecções virais, bacterianas ou outros organismos patogênicos. Devido ao avanço da medicina preventiva e curativa, nos últimos 100 anos houve um grande aumento na expectativa de vida da população, proporcionando um aumento na taxa de mortes por doenças degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. O controle destas doenças é complicado devido às suas naturezas multifatoriais, entretanto, no caso do câncer, estudos demonstraram um aumento na expectativa de vida de 15 à 20 anos em indivíduos portadores de cânceres (CIMMONS et al., 1995; LEVI et al., 2002; DE FLORA et al., 2005). Essas características demonstram que é possível prevenir o câncer não apenas em uma escala individual, mas também em uma escala global. Para isso, são necessárias medidas que possibilitem cada vez mais entender como se desenvolve o processo neoplásico, e também mecanismos pelo qual freá-lo ou desacelerá-lo, possibilitando assim, otimizar estratégias de prevenções para as populações.

1.1 Nutrição e Carcinogênese

Diversos estudos epidemiológicos têm relacionado o surgimento de neoplasias em diversos órgãos, como estômago, cólon, próstata e mama a uma dieta inapropriada (WCFR/AICR, 1997). Muitos estudos tentam esclarecer o processo de carcinogênese nestes órgãos e o principal fator causador tem sido atribuído a compostos químicos ou

processos celulares que alteram a molécula de DNA, resultando em mutação, possibilitando a ativação de oncogenes e também a perda de heterozigidade de genes supressores tumorais (FERGUSON et al., 2003).

Ao longo dos anos tem sido demonstrado que, vários compostos presentes na dieta, têm capacidade de induzir danos ao material genético. Entre os mutágenos presentes nos alimentos mais comuns e mais estudados encontram-se: compostos N-nitrosos (ex: alimentos embutidos e cervejas); várias toxinas fúngicas (ex: Aflatoxinas e as Fumonisinias); compostos mutagênicos formados durante o preparo de carnes (ex: aminas aromáticas heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e alimentos ricos em carboidratos (ex: acrilamida) (GELDERBLOM et al., 2001; LAYTON et al., 1995; JAGERSTAD e SKOG, 2005). A exposição a estes fatores está relacionada a uma maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias em alguns órgãos, principalmente do trato gastrointestinal (FERGUSON et al., 2003).

A presença de alguns micronutrientes (ex: Vitamina B12, Folato, Niacina, Magnésio, Zinco entre outros) é outro fator importante, que tem recebido muita atenção, uma vez que, são necessários em concentrações ótimas na dieta para a manutenção da estabilidade genômica. A ausência destes compostos em concentrações ótimas no organismo pode produzir efeitos similares aos obtidos na exposição a carcinógenos (FENECH e FERGUSSON, 2001).

Entretanto, existem também compostos da dieta que têm a capacidade de diminuir a frequência de mutação, compostos esses denominados antimutagênicos. A comunidade científica tem levantado a hipótese de que uma diminuição na taxa de mutação de um organismo poderia levar a um atraso no surgimento de neoplasias, o que poderia resultar no não surgimento das mesmas durante o período de vida do organismo (LOEB et al., 2003). Várias substâncias obtidas a partir de fontes naturais têm sido

isoladas, identificadas e alguns dos mecanismos de sua atividade estão sendo esclarecidos. A *N*-acetil-l-cisteína, o ácido p-aminobenzóico (PABA), os isotiocianetos aromáticos, as clorofilas e derivados, a glutatona, a vitamina C, a vitamina E, a vitamina A, os flavonóides, alguns ácidos graxos e as fibras dietéticas são algumas das substâncias antimutagênicas conhecidas encontradas na dieta (GEBHART, 1974; AMES, 1983; AMES, 1986; HARTMAN e SHANKEL, 1990; ODIN, 1997; LOHMAN *et al.*, 2001).

1.2 Quimioprevenção

De forma arbitrária, o tratamento do câncer pode ser dividido em 3 níveis de prevenção: I) prevenção primária (voltada a indivíduos saudáveis), II) prevenção secundária (voltada a pacientes em estados iniciais ou pré-clínicos) e III) prevenção terciária (voltada a pacientes após a terapia) (LAST, 1986; DE FLORA *et al.*, 2001).

A quimioprevenção pode ser classificada em primária ou secundária. Por definição, quimioprevenção é a administração de agentes farmacológicos (KELLOFF, 1994, 2004) ou compostos da dieta (na forma de macronutrientes, micronutrientes ou fitoquímicos não nutritivos) (FERGUSON, 1994; FERGUSON *et al.*, 2004; SUHR, 2003) que previnem a indução, inibem ou atrasam a progressão do câncer (SPORN, 1979) ou inibição ou reversão da carcinogênese em estágios pré-malignos (KELLOFF, 2000).

1.2.1 Classificação dos mecanismos de quimioprevenção

Virtualmente, todos os caminhos que levem a causar dano ao DNA e mais tarde dão início ao processo de carcinogênese são passíveis de modulação. A primeira

classificação utilizada para os quimiopreventivos foi a de Watenberg (1981) que os divide em dois grupos: a) agentes bloqueadores, que impedem que carcinógenos atuem no DNA e b) agentes supressores, os quais impossibilitam a evolução do processo neoplásico. De acordo com Morse e Stoner (1993), agentes bloqueadores são melhores classificados como inibidores de iniciação tumoral e agentes supressores como inibidores de promoção e progressão.

Kada et al. (1982), dividiu compostos antimutagênicos em: a) desmutágenos, compostos que inativam o mutágeno antes que este reaja com o DNA e b) bioantimutágenos, que interferem na fixação do dano na molécula de DNA. Mais tarde o ICPEMC (grupo de especialistas em antimutágenos e desmutágenos) classificou compostos antimutagênicos em fases: a) inibidores de fase I, aqueles que atuam extracelularmente e b) inibidores de fase II, que atuam intracelularmente (RAMEL et al., 1986).

Em 1988, De Flora, propôs uma classificação mais detalhada para agentes inibidores de mutagênese e carcinogênese, a qual é periodicamente revisada (DE FLORA e FERGUSON, 2005). De forma resumida, o esquema divide os mecanismos de quimioprevenção dentro dos 3 grupos de prevenção do câncer. Assim:

a. Prevenção primária:

a.1) Inibição de mutação e iniciação no ambiente extracelular ou células não alvo.

a.1.1) Inibição da absorção de mutágenos e carcinógenos.

a.1.2) Inibição da formação endógena de mutágenos e carcinógenos.

a.1.3) Complexação ou desativação de mutágenos fora da célula.

a.1.4) Favorecimento da absorção de agentes protetores.

a.1.5) Estimulação de captura e detoxificação em células não alvo.

a.2) Inibição de mutação e iniciação em células alvo

a.2.1) Modificação de transportadores de membrana.

a.2.2) Modulação do metabolismo.

a.2.3) Bloqueio ou competição.

a.2.4) Inibição de replicação celular.

a.2.5) Manutenção da estrutura do DNA e modulação de reparo.

a.2.6) Controle da expressão gênica.

a.3) Inibição de promoção tumoral.

a.3.1) Inibição de efeitos genotóxicos.

a.3.2) Atividade antioxidante e captura de radicais livres.

a.3.3) Atividade antiinflamatória.

a.3.4) Inibição de protease.

a.3.5) Inibição da proliferação celular.

a.3.6) Indução de diferenciação celular.

a.3.7) Modulação de apoptose.

a.3.8) Modulação da tradução de sinais

a.3.9) Proteção da comunicação celular.

b. Prevenção secundária:

b.1) Inibição de progressão tumoral

b.1.1) Inibição de efeito genotóxico.

b.1.2) Inibição de protease.

b.1.3) Atividade antioxidante e captura de radicais livres.

b.1.4) Modulação da tradução de sinais

- b.1.5) Efeito no padrão hormonal.
- b.1.6) Modulação do sistema imune.
- b.1.7) Inibição de angiogênese.
- b.1.8) Atividade antineoplásica.

c. Prevenção terciária:

c.1) Inibição de invasão e metástase

- c.1.1) Atividade antioxidante e captura de radicais livres.
- c.1.2) Modulação da tradução de sinais.
- c.1.3) Inibição da proliferação celular.
- c.1.4) Modulação da Apoptose.
- c.1.5) Indução de diferenciação celular.
- c.1.6) Inibição de Angiogênese.
- c.1.7) Efeito em moléculas de adesão celular.
- c.1.8) Inibição de proteases.
- c.1.9) Ativação de genes anti-metástases.

Na prevenção terciária, é importante ressaltar que apesar dela não se encaixar muito bem na definição de agentes quimiopreventivos (no *stricto sensu* da palavra), ela é demonstrada no esquema proposto, pois há uma sobreposição de efeitos, devido à coincidência com mecanismos de prevenção primária e secundária (DE FLORA, 2005). Vale ressaltar também que compostos que atuam inibindo uma dessas vias de carcinogênese e/ou mutagênese podem também atuar estimulando uma dessas vias (ex: Beta-caroteno, que atua como um antioxidante, porém em concentrações elevadas este pode atuar como pró-oxidante e estimulador de enzimas de fase I) (PALOZZA et al., 2006).

1.3 Beta Glucanas (BG)

Glucanas são polissacarídeos constituídos de unidades D-glicopiranosil que podem ser encontradas nas paredes celulares de uma variedade de organismos tais como cereais, plantas, algas, bactérias, fungos e leveduras. A estrutura macromolecular das glucanas depende tanto da fonte como do método de isolamento. As glucanas consistem de um esqueleto central linear formado por unidades D-glicopiranosil unidos por ligações β (1 \rightarrow 3), com ramificações que podem ser do tipo (1 \rightarrow 6) ou (1 \rightarrow 4) (Fig. 1), estas ligações podem variar tanto em comprimento como em distribuição, o que resulta em uma estrutura terciária estabilizada por pontes de hidrogênio intracadeia (ZEKOVIC et al, 2005).

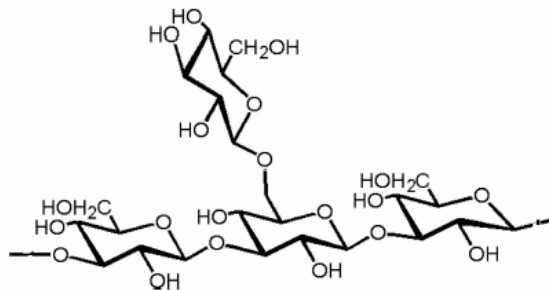


Figura 1: Molécula de BG de fungo, apresentando ligações β (1 \rightarrow 6), β (1 \rightarrow 3) (retirado de Zekovic et al., 2005)

Este grupo heterogêneo de poliglucoses com ligações beta, tem atraído o interesse das indústrias farmacêuticas e de pesquisas com alimentos funcionais devido ao seu efeito benéfico na saúde humana. Exemplos de seus efeitos benéficos incluem: estimulação do sistema imune, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral, hepatoprotetor, redução do colesterol, antifibrótico, antidiabético e atividade hipoglicêmica (BROWN et al., 2003; KOJIMA et al., 1986; ROBINS e SEELEY, 1977; SUTHERLAND, 1998; TREPEL, 2004).

Devido a esta heterogeneidade de efeitos biológicos relevantes para a saúde humana tem havido um grande interesse por parte de pesquisadores na identificação e caracterização de BG de diversas origens. Da mesma maneira que há interesse na caracterização química, existe também o interesse na modificação da estrutura destes compostos através da adição de grupamentos químicos (principalmente grupos sulfatos), especialmente com o intuito de aumentar a solubilidade do mesmo.

1.4 Ensaio de Mutagênese e cultura celular

O potencial mutagênico de xenobióticos pode ser avaliado através de ensaios *in vitro* desde que obedecem a critérios básicos como: sensibilidade para revelar com facilidade e precisão estatística mesmo um pequeno defeito mutagênico; reprodutibilidade e capacidade para avaliar eventos genéticos que possam estar diretamente relacionados ao homem, fornecendo uma estimativa de risco ou nível de segurança para a população exposta (RODRIGUES, 1991).

Vários métodos para detecção de mutações são utilizados, assim, dependendo da finalidade do estudo, do tipo de material a ser avaliado, do nível de informação que se deseja obter e das condições laboratoriais existentes, determina-se qual o sistema-teste e parâmetro a ser avaliado são os mais adequados. Entretanto, as diferenças na organização do material genético da célula, quando se comparam sistemas em microrganismos, vegetais e animais, fazem dos sistemas de mamíferos os mais aceitáveis para se tentar fazer uma extrapolação dos resultados obtidos para os possíveis efeitos causados ao homem (RABELLO-GAY, 1991).

Sistemas de células de mamíferos em cultura são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos ambientais em testes de curta duração (KURODA et al., 1992). Estes procedimentos estão sendo cada vez mais

empregados para identificar não só agentes mutagênicos/antimutagênicos como também o potencial carcinogênico/anticarcinogênico de compostos químicos (BROCKMAN et al., 1992) e são muito indicados devido às facilidades de administração das doses e manutenção (HEDDLE, 1982).

Testes com células de mamíferos em cultura apresentam várias vantagens: facilidade para padronizar as condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional) devido ao material ser relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; possibilidade de tratamento das células em várias fases do ciclo celular; economia, rapidez e boa reprodutibilidade; organização dos cromossomos e do seu DNA igual às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991), além de eficiência estatística, uma vez que o número de células analisadas é maior em relação a outros testes.

A maior desvantagem de ensaios em células de cultura *in vitro* é que a maioria das linhagens celulares não tem capacidade de metabolização de drogas, necessitando da adição de um sistema endógeno de metabolização como o S9 (PRESTON, 1997a). No entanto, esta dificuldade vem sendo contornada com a utilização de linhagens celulares proficientes em metabolização como, por exemplo, as linhagens hepáticas HepG2 e HTC (KNASMULLER et al., 2004).

1.4.1 Teste de aberrações cromossômicas (AC)

Alterações na estrutura cromossômica têm sido estudadas há quase um século e relacionadas com efeitos prejudiciais (BOVERI, 1902 apud TUCKER e PRESTON, 1996). Anomalias citogenéticas são hoje conhecidas em seus vários tipos e sabidamente são induzidas pelos mais diferentes agentes através de muitos mecanismos, dos quais

grande parte é bastante conhecida, mas muitos ainda não foram elucidados (PRESTON, 1995). Em mamíferos, anomalias cromossômicas têm sido observadas em virtualmente todos os tipos celulares e tecidos examinados, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (TUCKER e PRESTON, 1996).

O teste de aberrações cromossômicas *in vitro* tem se tornado muito importante como parte do controle de produção de medicamentos na fase I (ANVISA), frente ao potencial protetor de produtos farmacêuticos e de plantas, sendo exigido que estas substâncias se submetam a um estudo para indução de AC *in vitro* (MOLESSO, 1994), além de gerar muitas informações sobre os mecanismos de mutagenicidade induzida por agentes químicos e físicos, sendo muito empregado também na indicação a exposição humana a tais agentes (GALLOWAY et al., 1998).

A análise de AC é restrita às células mitóticas em metáfase pois, somente nessa fase do ciclo celular, o DNA está suficientemente condensado para ser observado na forma de cromossomo em microscópio ótico (BOEI, 1996). Para isto é necessário o tratamento das células com inibidores de polimerização do fuso mitótico, como colchicina e colcemide.

As ACs podem ser classificadas como estruturais e numéricas. As aberrações numéricas podem ser originadas pela ação de agentes aneugênicos, responsáveis por uma segregação incorreta dos cromossomos durante a anáfase, observando perda ou ganho de cromossomos inteiros (SWIERENGA et al., 1991). As ACs estruturais são alterações na estrutura cromossômica, visíveis microscopicamente, que envolvem quebra(s) de fita(s) do DNA, seguida(s) ou não de rearranjo anormal dos fragmentos do (s) cromossomo(s) quebrado(s). A quebra pode ser completa em uma única cromátide (quebra cromatídica) ou em ambas as cromátides (quebra isocromatídica), resultando na perda ou deleção de parte do material cromossômico, translocação ou outros rearranjos.

São consideradas quebras quando a falta do material no cromossomo é maior do que a largura da cromátide ou quando há um deslocamento de uma ou ambas as cromátides em relação ao resto do cromossomo (SWIERENGA et al., 1991). Também é possível observar outras aberrações como anéis, cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos e outros rearranjos mais complexos que geralmente levam à morte celular, pois promovem uma disfunção na distribuição do material genético durante um novo ciclo de divisão celular.

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

1.4.2 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Os Micronúcleos (MN) são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma. Aparecem na telófase e são resultado de fragmentos acêntricos (originados de quebra isocromatídica ou cromatídica) ou de disfunções no fuso mitótico. Desta forma, podem ser gerados por agentes clastogênicos e aneugênicos. Pode haver um ou mais MN por célula e tais corpúsculos não devem apresentar qualquer conexão estrutural com o núcleo principal, birrefringência ou ter mais do que 1/3 do tamanho do núcleo principal. (MERSCH et al., 1996; KIRSCH-VOLDERS e FENECH, 2001).

A aplicação do bloqueio da citocinese, com a citocalasina-B (Cyt-B) permite identificar células que tenham passado por um ciclo de mitose após o tratamento *in vitro*. Esta variação técnica tem transformado o teste do MN em uma ferramenta útil na triagem de danos genéticos (FENECH e MORLEY, 1985). A Cyt-B é um potente

inibidor dos microfilamentos de actina, impedindo a polimerização dos mesmos na placa equatorial formada no final da telófase desta forma, observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese. A análise é feita contabilizando as células binucleadas que apresentam micronúcleos, uma vez que, somente estas realmente apresentam danos causados pelo tratamento induzido.

É interessante ressaltar que estudos recentes demonstraram que um aumento de micronúcleos em linfócitos periféricos está diretamente relacionado ao surgimento de neoplasias (Bonassi et al., *in press*).

1.4.3 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) é um método sensível para quantificar quebras de fita no DNA (OSTLING e JOHANSON, 1984). Este tem atraído atenção na última década devido à sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, velocidade e economia, visto a quantidade crescente de publicações que têm utilizado o mesmo (COLLINS, 2004).

Após embeber células em agarose e depositá-las em uma lâmina, estas são lisadas com Triton X-100 e 2,5M NaCl para remoção do citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando apenas DNA super-enovelado, na forma de nucleóides. Durante a eletroforese, o DNA é atraído ao ânodo, porém, movimentos significativos tomam lugar apenas onde há a presença de quebras, onde uma cauda que se estende do nucleóide pode ser evidenciada. Cometas podem ser formados sob condições de eletroforese neutras ou básicas, entretanto, a variável mais utilizada apresenta um tratamento prévio a eletroforese com NaOH/EDTA a um pH superior a 13, desta forma permitindo o relaxamento da dupla hélice (SINGH et al., 1988). Após a eletroforese as

lâminas são coradas com corantes fluorescentes que se intercalam ao DNA (brometo de etídeo, laranja de acridina, entre outros) e podem então ser analisadas visualmente ou através da ajuda de softwares.

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

3) Objetivo Geral

Avaliar o possível efeito genotóxico e ou antigenotóxico de BGs de origem vegetal e fúngica.

3.1) Objetivo Especifico

Avaliar o efeito protetor de BG de cevada frente a diferentes agentes indutores de danos e inibidor de reparo, em linhagem proficiente em metabolização, através do teste de AC (Artigo 1).

Avaliar o efeito protetor e possível mecanismo de ação de BG de origem fúngica em linfócitos humanos frente ao Trp-p-2, H₂O₂ e BPDE através do teste do cometa (Artigo 2).

Avaliar o efeito protetor da BG de cevada frente aos danos induzidos pelo B[a]P em linhagem hepática humana utilizando o teste do cometa e diferentes protocolos de tratamento (Artigo 3).

Avaliar o efeito protetor da BG de *Agaricus blazei* frente aos danos induzidos pelo B[a]P em linhagem hepática humana utilizando o teste do micronúcleo e cometa em diferentes tipos de tratamento (Artigo 4).

Avaliar o efeito protetor de polissacarídeos de parede e BGs extraídas em diferentes fases do desenvolvimento do cogumelo *Agaricus blazei* contra os danos induzidos por agentes formadores de ROS (Artigo 5).

Artigo 1

Artigo publicado no periódico “Human and Experimental Toxicology”

Volume 25; pp 319-324, 2006 (*Anexo 1*)

Anticlastogenic effect of β -glucan extracted from barley towards chemically induced DNA damage in rodent cells

José Pedro F. Angeli, Lúcia Regina Ribeiro, Marilanda Ferreira Bellini, Mário Sérgio Mantovani

Abstract:

β -Glucan (BG) was tested *in vitro* to determine its potential clastogenic and/or anticlastogenic activity, and attempts were made to elucidate its possible mechanism of action by using combinations with an inhibitor of DNA polymerase. The study was carried out in a cells deficient (CHO-k1) and cells proficient (HTC) in phase I and phase II enzymes, and the DNA damage was assessed by the chromosomal aberration assay. BG did not show a clastogenic effect, but rather was anticlastogenic in both cell lines used, and at all concentrations tested (2.5, 5 and 10 μ g/ml) in combination with damage inducing agents (methylmethane sulfonate in cell line CHO-k1 and methylmethane sulfonate or 2-aminoanthracene in cell line HTC). BG also showed a protective effect in the presence of a DNA polymerase β inhibitor (cytosine arabinoside-3-phosphate, Ara-C), demonstrating that BG does not act through an antimutagenic mechanism of action involving DNA polymerase β .

Key words: β -glucans, chromosomal aberrations, antimutagenesis, drug-metabolizing cells.

Artigo 2

Artigo publicado no periodico "Cell Biology and Toxicology"

Volume 22; pp 285-291, 2006 (*Anexo 2*)

**Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against
chemically induced DNA damage in human lymphocytes**

Angeli, J.P.F; Ribeiro, L.R; Gonzaga M.L.C; Soares S. de A; Ricardo, M.P.S.N;
Tsuboy M.S; Stidl, R; Knasmueller, S; Linhares, R.E ;Mantovani, M.S

Abstract

β -Glucans (BG) are polysaccharides that are found in the cell walls of organisms such as bacteria, fungi and some cereals. The objective of the present study was to investigate the genotoxic and antigenotoxic effects of BG extracted from the mushroom *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann). The mutagenic activity of BG was tested in single cell gel electrophoresis assays with human peripheral lymphocytes. In addition, the protective effects against the cooked food mutagen 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) and (+/-)-anti-B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) which is the main metabolite of B(a)P, and against ROS (H₂O₂)-induced DNA damage were studied. The results showed that the compound itself was devoid of mutagenic activity, and that a significant dose-dependent protective effect against damage induced by hydrogen peroxide and Trp-P-2 occurred in the dose range of 20-80 μ g/ml. In order to explain the prevention of Trp-P-2-induced DNA damage, a binding assay was carried out to determine if BG inactivates the amine via direct binding. Since no such interactions were observed, it is likely that BG interacts with enzymes involved in the metabolism of the amine.

Key Words: *Agaricus brasiliensis*, BPDE, comet assay, β -glucan, hydrogen peroxide, Trp-P-2.

Artigo 3

Artigo a ser submetido ao periódico "Toxicology *In Vitro*"

Redução do efeito genotóxico do benzo[a]pireno em células de hepatoma humano (HepG2) tratadas com β -glucana extraída de cevada

J.P.F. Angeli^a; L.R. Ribeiro^b; M. F. Bellini^c; J.L.F. Angeli^a; M.S. Mantovani^{a*}

a) Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; b) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Depto. de Biologia, UNESP Rio Claro, SP, Brazil e Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; c) Programa de Pós-Graduação Genética, Depto. de Biologia, UNESP São José do Rio Preto, SP, Brazil

Resumo

Beta-glucanas (BG) são componentes de parede celular, e são encontradas em grandes quantidades em alguns organismos tais como fungos, bactérias e cereais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetor da BG extraída de cevada contra os danos induzidos pelo carcinógeno B[a]P. O teste do cometa foi utilizado para avaliar tanto a genotoxicidade como a antígenotoxicidade da BG. Com a finalidade de esclarecer de que maneira a BG poderia estar expressando o seu efeito protetor (desmutagênese ou bio-antimutagênese) foram utilizados 4 protocolos de tratamentos (pré-tratamento, simultâneo simples, simultâneo com pré-incubação e pós-tratamento). Os resultados mostraram que a BG não apresentou efeito genotóxico nas concentrações de 1, 5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ porem foi genotóxica na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ e citotóxica na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$. Para a antígenotoxicidade foram utilizadas as 3 menores concentrações. Nestas a BG foi efetiva na redução do efeito genotóxico do B[a]P em todos os

protocolos testados sendo que uma maior eficiência foi encontrada nos protocolos simultâneo simples e simultâneo com pré-incubação. Assim, os dados do presente estudo sugerem que a BG pode estar atuando por se ligar diretamente ao composto genotóxico ou pela captura dos radicais livres produzidos durante a sua ativação podendo ser considerado um agente protetor desmutagênico. No entanto, o efeito protetor observado no pré-tratamento sugere a possibilidade da BG estar modulando o metabolismo celular (ex: inibição de enzimas de fase I), diminuindo, assim, a formação de compostos reativos. Já os resultados obtidos no pós-tratamento poderiam indicar uma possível modulação do reparo de DNA ou apoptose. Esses dois resultados sugerem atividade protetora do tipo bio-antimutagênese.

1. Introdução

O desenvolvimento do câncer é um processo longo precedido por uma série de eventos, culminando, nos seus estágios finais na migração das células neoplásicas para outras partes do organismo. Apesar dos avanços científicos, a terapia clínica para o câncer, que incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, particularmente durante a fase terminal de metástase, são muito limitadas. Entretanto, existem evidências de estudos epidemiológicos e patológicos, que muitos cânceres humanos podem ser prevenidos ou ter o seu crescimento retardado (Weinstein., 1991). Desta forma, existe a possibilidade de interferir ou mesmo prevenir a progressão de cânceres nas etapas iniciais da carcinogênese, estratégias estas que ainda não são levadas em conta pela comunidade médica (Chen., 2005). Este tipo de abordagem é designada de quimioprevenção. Hoje em dia diversos estudos sugerem que o consumo de frutas,

vegetais e grãos apresentam em geral um efeito inverso ao surgimento de doenças degenerativas, como é o caso do câncer (Potter et al., 1997; Ferguson and Harris 2003).

Desta forma, a comunidade científica tem tido o seu interesse atraído para o estudo de compostos da dieta que podem atuar de forma a proteger o material genético, uma vez que eventos mutacionais estão envolvidos nas primeiras etapas da carcinogênese. Entre os componentes da dieta que vem chamando a atenção, estão as β -glucanas (BG). BG são polissacarídeos constituídos de unidades D-glucopiranosil, que podem ser encontradas em uma variedade de organismos como cereais, plantas, algas, bactérias, fungos e leveduras. A estrutura macromolecular das glucanas depende tanto da fonte como do método de isolamento e purificação. As glucanas consistem de um esqueleto central linear formado por unidades D-glucopiranosil unidos por ligações β (1 \rightarrow 3), com ramificações que podem ser do tipo (1 \rightarrow 6) ou (1 \rightarrow 4). Estas ligações podem variar tanto em comprimento como em distribuição, o que resulta em uma estrutura terciária estabilizada por pontes de hidrogênio intracadeia. As BG (1 \rightarrow 3), com ramificações (1 \rightarrow 4), parecem estar restritas a família das Gramineae, sendo o principal componente da parede do endosperma de cereais comercialmente importantes, como é o caso da cevada, sorgo, arroz, aveia e trigo (Zekovic et al., 2005).

Dentre os efeitos benéficos das BG podemos destacar a estimulação do sistema imune contra infecções bacterianas (Cisneros and Tzianabos 1996), viral (Reynolds et al., 1980), fúngicas (Meira et al., 1996) e parasítica (Holbrook et al., 1981); a modulação do sistema imune humoral e celular (Falch et al., 2000), estimulação de hematopoiese (Hoefer and Pospsil, 1997) e estimulação de macrófagos (Rankin et al., 1990). Mais recentemente, alguns estudos têm comprovado o seu efeito protetor ao material genético (Slamenova et al., 2003; Tohamy et al., 2003; Lin et al., 2004; Angeli et al., 2006a; Angeli et al., 2006b; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito genotóxico e/ou antigenotóxico de BG extraída de cevada na linhagem celular hepática humana HepG2. Foram empregados no estudo diferentes protocolos de tratamento, buscando elucidar o possível mecanismo pelo qual a BG estaria expressando o seu efeito protetor.

2. Materiais e Métodos

2.1. Agentes químicos

O dano ao DNA foi induzido pelo benzo[a]pireno (Fluka) na concentração de 20µg/mL de meio de cultura. Para isto o agente foi diluído em DMSO (JT Baker) não ultrapassando a concentração de 1% em cultura.

A BG utilizada neste experimento foi adquirida da empresa Sigma (99% de pureza) e diluída em PBS. Esta BG apresenta ligações do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ ($1\rightarrow4$). Foram utilizadas 5 concentrações para o experimento (B1 – 1µg/ml; B2 – 5µg/ml; B3 – 25µg/ml; B4 – 100µg/ml; B5 – 200µg/ml de meio de cultura) e estas estipuladas de acordo com o trabalho prévio de Oliveira et al (2006).

2.2. Linhagem celular

A linhagem celular hepática humana, HepG2, foi gentilmente cedido pelo Dr. Sigfried Knasmuller do Instituto de Pesquisa do Câncer, Universidade de Viena, Áustria. Os estoques celulares foram mantidos em freezer -80°C , em soro bovino fetal + 10% DMSO.

As culturas foram mantidas de acordo com o protocolo proposto por Uhl et al (1999). As células foram cultivadas em frascos de cultura (TPP) de 75cm², em meio MEM suplementado com 15% de soro bovino fetal, em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, até atingirem confluência. Após esse período, as culturas foram tripsinizadas (0,1%) e semeadas 2x10⁵ células/poços em placas de 24 poços, e incubadas por mais 24 horas quando, então, foram realizados os tratamentos.

2.3. Single cell gel electrophoresis (Ensaio do Cometa)

Para o ensaio do cometa foi utilizado o protocolo proposto por Uhl et al., (1999, 2000) de acordo com as premissas propostas por Tice et al., (2000). As cultura foram divididas em dois grupos experimentais: a) na genotoxicidade foram testadas 5 concentrações de BG (1µg/mL – BG1; 5µg/mL – BG2; 25µg/mL – BG3; 100µg/mL – BG4; 200µg/mL – BG5). b) na antigenotoxicidade as 3 concentrações menores de BG foram associadas ao B[a]P, uma vez que estas foram as únicas a não apresentarem efeito genotóxico ou citotóxico. Nos protocolos de antigenotoxicidade utilizamos pré-tratamento, tratamento simultâneo (simples e com pré-incubação) e pós-tratamento como descrito abaixo. Como controle negativo foi utilizado DMSO a 1%.

Os protocolos utilizados foram:

- a) Pré-tratamento: As células HepG2 foram cultivadas por 24 horas antes do tratamento. Após este período o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Então era adicionado meio livre de soro e as diferentes concentrações de BG por 24 horas. Após essas 24 horas foi realizada a lavagem das células com PBS e adicionado meio sem soro juntamente com o B[a]P, por mais 24 horas.

- b) Tratamento simultâneo simples: As células foram cultivadas inicialmente por 24 horas e então foi retirado o meio de cultura e as células lavadas com PBS. Após isso, foi adicionado meio livre de soro juntamente com as diferentes concentrações de BG e o B[a]P, por mais 24 horas.
- c) Tratamento simultâneo com pré-incubação: Idêntico ao tratamento simultâneo descrito acima, entretanto a BG e o B[a]P a ser adicionado a cultura foram incubados antes do tratamento em uma única solução por 1h em estufa do tipo BOD a 37°C.
- d) Pós-tratamento: As células foram cultivadas por 24 horas, lavadas com PBS e adicionado meio sem soro junto com o B[a]P, por 24 horas. Após isto as células foram lavadas novamente com PBS e adicionado meio completo contendo BG nas diferentes concentrações, por mais 24 horas.

Ao final dos tratamentos as células foram coletadas, e uma pequena amostra utilizada para a análise de citotoxicidade pelo método do Azul de Trypan. O restante das células foi, então, embebido em agarose de baixo ponto de fusão e adicionadas a uma lâmina previamente recoberta com agarose, seguido de lise onde permanecia overnight, sendo então realizada a eletroforese (25V a 300mA).

2.4. Análise das lâminas e estatística

Para cada tratamento foram realizadas 3 repetições independentes. Para o ensaio do cometa foram analisadas 100 células, visualmente (Kobayashi et al., 1995), e classificadas de acordo com o seguinte critério: (classe 0) células com dano indetectável, que não apresentavam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do núcleo; (classe 2) células com cauda entre 1 a duas vezes o diâmetro do núcleo; (classe 3) células com cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Após

isto o valor de cada célula era somado para obter o score (variável de 0 a 300), após isto era calculado a média e os desvios de cada tratamento. Células apoptóticas que apresentaram o núcleo totalmente fragmentado não foram levadas em consideração na análise (Speit and Hartmann, 2005). O ensaio do cometa foi realizado somente para tratamentos que apresentaram viabilidade superior a 80%, como mostrado pelo teste do Azul de Trypan.

Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico Prism 4.0 realizando o teste de Mann-Whitney ($p > 0.05$), para verificar diferenças entre os tratamentos.

3. Resultados

Os resultados obtidos para a genotoxicidade estão representados na Figura 1. As três concentrações menores de BG testadas (1, 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram efeito genotóxico. No entanto a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentou alteração na migração de DNA, uma vez que o escore foi aproximadamente duas vezes maior que o encontrado no controle negativo. A maior concentração avaliada (200 $\mu\text{g/mL}$) não foi testada no ensaio do cometa, uma vez que a mesma apresentou efeito citotóxico, reduzindo a viabilidade celular para aproximadamente 70%. As demais concentrações testadas não apresentaram efeito citotóxico elevado, uma vez que em todos os tratamentos a viabilidade celular permaneceu superior a 80%.

As Figuras de 2 a 5 mostram os resultados dos protocolos de antigenotoxicidade (pré-tratamento, simultâneo simples, pré-incubação+simultâneo e pós-tratamento, respectivamente). No protocolo de pré-tratamento (Figura 2) apenas a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou efeito protetor, sendo que as demais não diferiram do controle B[a]P (controle positivo). Para o tratamento simultâneo simples (Figura 3), as

concentrações de 5 e 25µg/mL apresentaram efeito protetor, sendo que somente a menor concentração (1µg/mL) não diferiu do controle B[a]P. Já no tratamento simultâneo com pré-incubação (Figura 4) ocorreu efeito protetor das concentrações de 5 e 25µg/mL. Semelhantemente, o pós-tratamento (Figura 5) apresentou efeito protetor para as doses de 5 e 25µg/mL. No entanto, pode-se observar, que neste protocolo ocorreram os menores níveis de viabilidade celular, quando comparado aos outros protocolos utilizados.

4. Discussão

Nos últimos anos têm havido um crescente interesse por substâncias que possam proteger ou minimizar os danos causados ao material genético humano por diversos contaminantes ao qual o homem está exposto. Desta forma o presente trabalho investigou o efeito genotóxico e antígenotóxico da BG extraída de cevada contra os danos induzidos pelo B[a]P. Este foi escolhido por ser um contaminante comumente encontrado no meio em que o homem se expõe, tanto em alimentos como no ar que ele respira. Além disso, diferentes protocolos de tratamentos foram utilizados para esclarecer o possível tipo de mecanismo de ação pelo qual a BG estaria causando ao seu efeito protetor. Este efeito seria desmutagênico quando apresenta efeito protetor no protocolo do tipo simultâneo com pré-incubação, ou bio-antimutagênico quando apresenta um efeito protetor no pré e no pós-tratamento (Kada & Shimoi 1987). No presente estudo, foi demonstrado que a BG extraída de cevada apresentou um efeito genotóxico na concentração de 100µg/mL na linhagem celular HepG2. Oliveira et al., 2006, utilizando a mesma BG, demonstrou que a concentração de 20µg/mL apresentou aumento na formação de micronúcleos nas linhagens CHO-K1 e HTC, esta diferença de resposta pode se explicar pela diferença na linhagem celular utilizada. Fatos estes não

estranhos, uma vez que é sabido que alguns compostos com potencial antigenotóxico podem vir a apresentar também efeitos genotóxicos em determinadas concentrações (Zeiger 2003). Este resultado nos mostra que BGs que apresentam ligações do tipo $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$, apresentam um efeito tóxico mais elevado do que as que apresentam ligações do tipo $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$, uma vez que trabalhos utilizando BG com este último tipo de ligação não demonstraram efeito deletério, mesmo em concentrações superiores (Angeli et al., 2006a; Oliveira et al. 2007).

O protocolo de pré-tratamento provou ser o menos eficaz contra os danos causados pelo B[a]P, uma vez que somente a maior concentração testada mostrou-se protetora. Estes dados indicam que a BG poderia estar atuando, possivelmente, modulando enzimas de fase I e II. Resultados anteriores nos levam a crer que a BG seria mais eficaz sobre enzimas de fase I, talvez inibindo-as, uma vez que no trabalho de Angeli et al (2006b), uma BG de origem fúngica não apresentou efeito protetor contra os danos causados pelo BPDE, produto final da ativação do B[a]P, alvo das enzimas de fase II. Estudos recentes demonstraram que a BG de origem fúngica atuou em ratos de forma a reduzir a expressão de enzimas CYPs (Okamoto et al., 2004). Contudo, a presença da BG no interior da célula parece ser ainda uma especulação. Isso implica que o efeito protetor em pré-tratamento pode ser devido a estímulos na superfície celular, em receptores ativando vias de sinalização, até o processo de controle da própria expressão gênica, podendo ser considerado uma modulação do metabolismo celular de uma forma indireta.

Os protocolos de tratamento simultâneo foram os que apresentaram o maior efeito protetor. Isto poderia estar ligado ao fato de que, neste tipo de protocolo, todos os tipos de defesa celular estariam passíveis de modulação pelas BG. Desta forma, as BG poderiam estar atuando de modo a capturar o B[a]P e inibindo a sua ativação, uma vez

que esta se mostrou capaz de se ligar a diferentes tipos de compostos como ofloxacina e diversas micotoxinas (Devegowda et al., 1998; Krizkova et al., 2006). Isto pode ser reforçado pelo fato de que o tratamento simultâneo com pré-incubação demonstrou maior redução de danos, quando comparado ao tratamento simultâneo simples. Esses dados corroboram os de Oliveira et al (2006), onde os autores constataram que a pré-incubação da BG com os agentes metilmetanosulfonato e 2-aminoantraceno aumentava o efeito protetor, quando comparado a o tratamento simultâneo sem pré-incubação. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que a BG poderia estar atuando como capturador de radicais livres formados durante a ativação do B[a]P pelas enzimas CYPs, visto que BG apresentam efeito antioxidante (Chovartovicova et al., 1999; Krizkova et al., 2006; Angeli et al., 2006a).

Para os protocolos de pós-tratamento as concentrações de 5 e 25ug/mL também apresentaram efeito protetor. Entretanto, a redução de dano foi menos eficiente quando comparada ao dos tratamentos simultâneo simples e simultâneo com pré-incubação. Oliveira et al (2006) também encontraram efeito protetor no protocolo de pós-tratamento, quando induziram dano com 2-aminoantraceno e metilmetanosulfonato sugerindo atividade do tipo bio-antimutagênese. Angeli et al (2006b), em outro trabalho quando utilizamos um inibidor de DNA polimerase, em associação com o metilmetanosulfonato, observamos que a BG continuou apresentando eficácia na redução de danos, o que indica que a mesma não estaria atuando no estímulo da DNA polimerase. Este fato sugere possível modulação de outros tipos de proteínas associadas ao reparo, ou mesmo indução de apoptose, uma vez que nos protocolos de pós-tratamento foram observados os menores níveis de viabilidade celular.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstram que a BG $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ extraída de cevada, apresentou efeito protetor contra os danos genotóxicos induzidos pelo pró-carcinógeno B[a]P. Desta forma pode-se considerar que este composto seria um quimiopreventivo efetivo, diminuindo a taxa de lesões ao DNA, protegendo células humanas contra compostos como o B[a]P ao qual o homem esta exposto e que pode interagir de forma nociva com o material genético e assim levar ao surgimento de diferentes doenças degenerativas como é caso do câncer. Os resultados mostram, ainda, que esta molécula possui características antimutagênicas tanto do tipo desmutagênica, como sugerido pelos protocolos simultâneo simples e com pré-incubação), bem como bio-antimutagênica, como sugerido pelos protocolos pré e pós-tratamento.

Agradecimento:

Agradecemos o apoio financeiro das instituições financeiras: CAPES, CNPq e Fundação Araucária

5. Referencias

Angeli, J.P.F., Ribeiro, L.R., Gonzaga, M.L.C., Soares de S. A., Ricardo, M.P.S.N., Tsuboy, M.S., Stidl, R., Knasmuller, S., Linhares R. E., Mantovani, M.S., 2006a. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. Cell biology and toxicology 22, 285-291.

- Angeli, J.P.F., Ribeiro, L.R., Bellini, M.F., Mantovani, M.S., 2006b. Anti-clastogenic effect of beta-glucan extracted from barley towards chemically induced DNA damage in rodent cells. *Human and Experimental Toxicology* 25, 319-24.
- Brown, G.D., Gordon, S., 2003. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311-315.
- Chen, C., Kong, A.N.T., 2005. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *TRENDS in pharmacological sciences* 26, 318-326.
- Chorvatovicová, D., 1991. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co60 in mice. *Strahlenther Onkologie* 167, 612-614.
- Cisneros, R. L., Gibson, F. C., Tzianabos, A. O., 1996. Passive transfer of poly-(1-6)- β -glucotriosyl-(1-3)- β -glucopyranose glucana protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis, *Infection and Immunology* 64, 2201-2205.
- Davegowda, G., Raju, M.V.L.N., Swamy, H.V.L.N., 1998. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs* 70, 12-15.

- Falch, B.H., Espevik, T., Ryan, L., Stokke, B.T., 2000. The cytokine stimulating activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation, *Carbohydr. Res.* 329 587-596.
- Ferguson, L.R., Harris,P.J., 2003. The dietary fibre debate: more food for thought, *Lancet* 361 1487–1488.
- Hofer, M., Pospisil, M., 1997. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice: a survey of the authors results. *International Journal of Immunopharmacology.* 19, 607–609.
- Holbrook, T.W., Cook, J.A., Parker, B.W., 1981. Immunization against *Leishmania* dovavani: glucana as an adjuvant with killed promastigotes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 30, 762–768.
- Kada, T., Shimoi K., 1987. Desmutagens and bio-antimutagens – their mode of action. *Bioessays.* 7, 113-116.
- Knasmuller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A.T., 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research* 402, 185-202.

- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between the manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS communication* 3, 103-115.
- Krizkova, L., Zitnanova, I., Mislovicova, D., Masarova, J., Sasinkova, V., Durackova, Z., Krajcovicova, J., 2006. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan-human serum albumine and mannan-penicillin G acylase. *Mutation Research* 606, 72-79.
- Lin, H., She, Y., Cassileth, B., Sirotnak, F., Rundles, S.C., 2004. Maitake beta-glucan MD- fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. *International Immunopharmacology* 4, 91-99.
- Meira D. A., Pereira, P. C. M., Marcondes-Machado, J., Barravieira, R.P., Pellegrino, J. R. J., Rezkallah-Iwasso, M. T., Peraçoli, M. T. S., Castilho, L. M., Thomzaini, I., Silva, C. L., Foss, N.T., Curi, P.R., 1996. The use of glucan as immunostimulant in treatment of paracoccidiomycosis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55, 496-503.
- Okamoto, T., Kodoi, R., Nonaka, Y., 2004. Lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) suppresses expression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. *Biofactors* 21, 407- 374.

- 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.
- Oliveira, R. J., Matuo, R., Silva, A. F., Matiazi, H. J., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., 2007. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (K1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells, *Toxicol. In Vitro* 21, 41-52.
- Potter, J.P., Chavez, A., J. Chen(Eds.),1997. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective, World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research, Washington, DC,.
- Rankin, A.J., Sylvester, I., Smith, S., Yoshimura, T., Leonard, E.J., 1990. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J. Clin. Invest.* 86, 1556–1564.
- Reynolds, J. A., Kastello, M. D., Harrington, D. G., Crabs, C. L., Peters, C. J., Jemski, J. V., Scott, G. H., Di Luzio, N. R., 1980. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases, *Infection and Immunology* 30, 51-57.

- Slamenová, D., Lábaj, J., Krizková, L., Kogan, G., Sandula, J., Bresgen, N., Eckl, P., 2003. Protective effects of fungal β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Letters* 198, 153–160.
- Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods in Molecular Biology* 291, 85-95.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 206-221.
- Tohamy, A. A., El-Gohr, A. A., El-Nahas, S. M., Noshay, M. M., 2003. β -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. *Mutation Research* 541, 45-53.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 1999. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutat. Res.* 441, 215-224.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat. Res.* 468, 213-225.
- Weinstein, I.B., 1991. Cancer prevention: recent progress and future opportunities. *Cancer Research* 51, 5080–5085.

Zeiger, E., 2003. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutat. Res.* 543, 191-194.

Zekovic, D.B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M.M., Jakovljevic, D., Moran, C.A., 2005. Natural and modified (1→3)- β -glucans in health promotion and disease alleviation, *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 205-230.

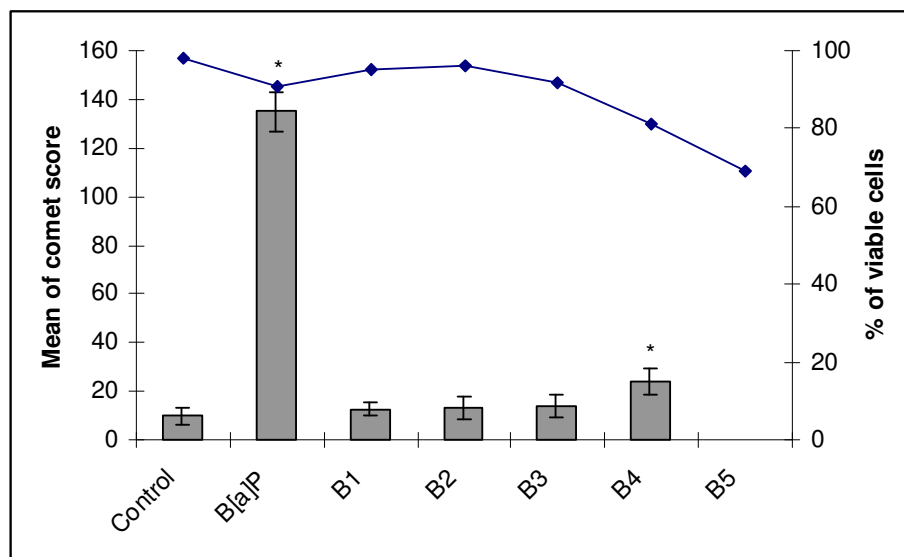


Figura 1: Barras representando o escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de cevada. Linha representando a viabilidade celular (determinada pelo azul de trypan). Control (DMSO-1%); B[a]P - 20 μ g/mL; B1 - BG 1 μ g/mL; B2 – BG

5 μ g/mL; B3 – BG 25 μ g/mL; B4 – BG 100 μ g/mL; B5 – BG 200 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do controle ($p>0.05$)

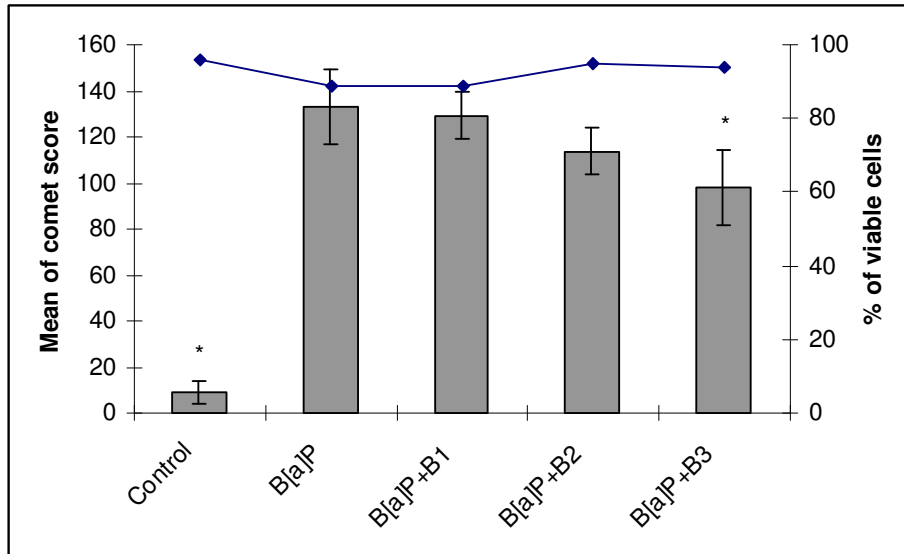


Figura 2: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de cevada associada ao B[a]P, em pré-tratamento. Linha representando a viabilidade celular (determinada pelo azul de trypan). B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 1 μ g/mL; B2 – BG 5 μ g/mL; B3 – BG 25 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p>0.05$).

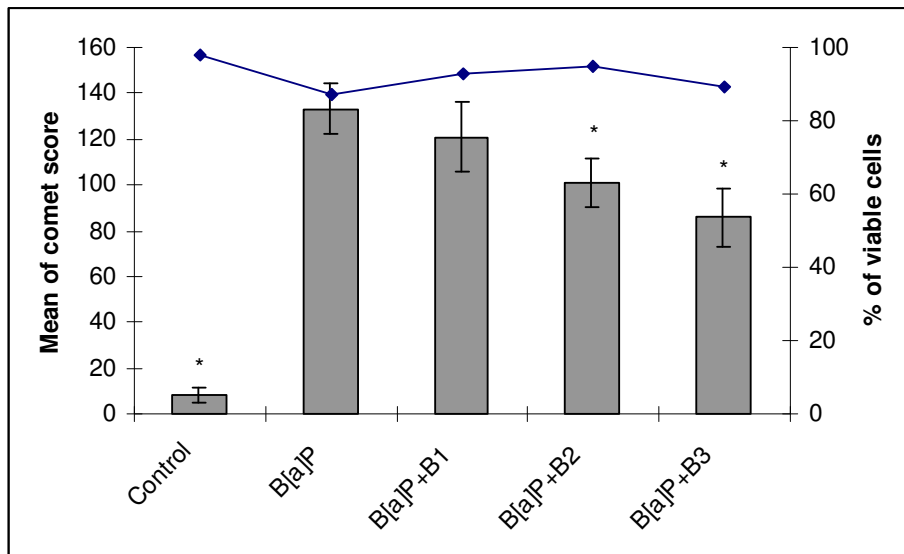


Figura 3: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de cevada associada ao B[a]P, em tratamento simultâneo simples. Linha representando a viabilidade celular (determinada pelo azul de trypan). B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 1 μ g/mL; B2 – BG 5 μ g/mL; B3 – BG 25 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p>0.05$).

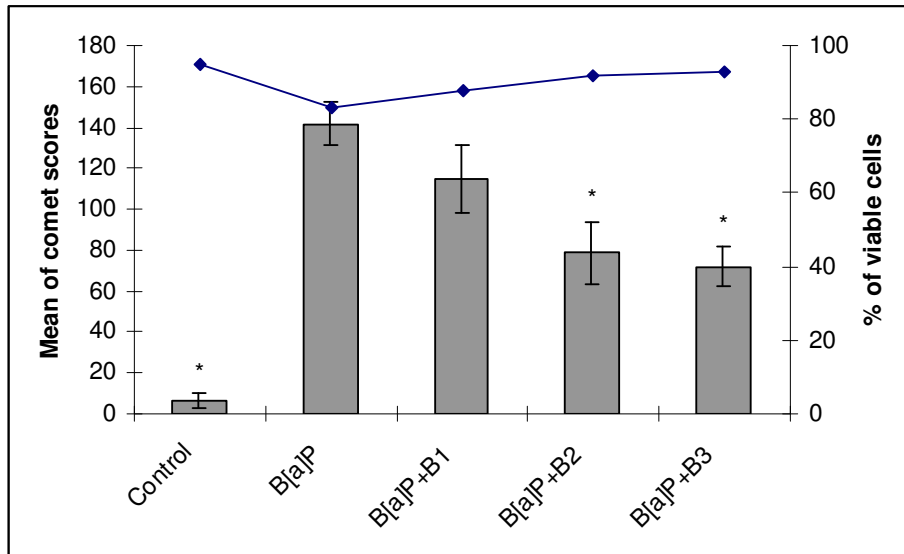


Figura 4: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de cevada associada ao B[a]P, em tratamento simultâneo com pré-incubação. Linha representando a viabilidade celular (determinada pelo azul de trypan). B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 1 μ g/mL; B2 – BG 5 μ g/mL; B3 – BG 25 μ g/mL. (*) estatisticamente significativo do B[a]P ($p > 0.05$).

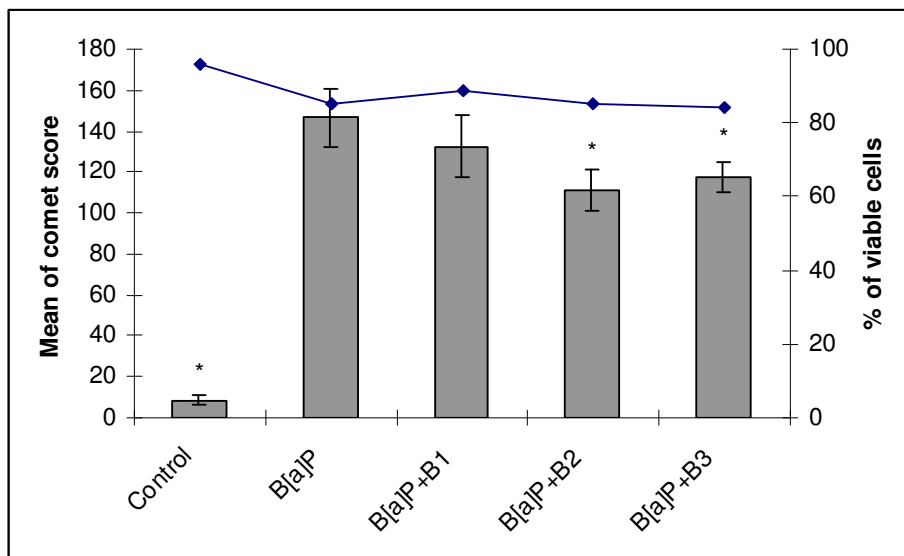


Figura 5: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de cevada associada ao B[a]P, em pós-tratamento. Linha representando a viabilidade celular (determinada pelo azul de trypan). B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 1 μ g/mL; B2 – BG 5 μ g/mL; B3 – BG 25 μ g/mL. (*) estatisticamente significativo do B[a]P ($p > 0.05$).

Artigo 4

Artigo a ser submetido ao periódico "Food and Chemical Toxicology"

β -glucana extraída do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* previne efeitos genotóxicos e mutagênicos causados pelo Benzo[a]pireno em linhagem de hepatoma humano

J.P.F. Angeli ^a; L.R. Ribeiro ^b; M. F. Bellini ^c; S. de A. Soares ^d; M.S. Mantovani

a*

a) Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; b) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Depto. de Biologia, UNESP Rio Claro, SP, Brazil; c) Programa de Pós-Graduação Genética, Depto. de Biologia, UNESP São José do Rio Preto, SP, Brazil e Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; d) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil;

Resumo

As Betas-glucanas (BG) podem ser encontradas em diferentes organismos como componentes da parede celular. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetor da BG extraída de *Agaricus blazei* contra os danos induzidos pelo carcinógeno B[a]P. Para isto utilizamos os ensaios do cometa (genotoxicidade) e do micronúcleo com bloqueio de citocinese (mutagenicidade) na linhagem de hepatoma humano (HepG2). Três protocolos de tratamento foram testados (simultâneo, pré-tratamento e o pré+simultâneo) afim de esclarecer o possível mecanismo de ação (desmutagênese ou bio-antimutagênese) pelo qual esta molécula estaria protegendo o DNA. Os resultados mostraram que a BG protegeu contra os danos no DNA em todos os protocolos testados, sendo que a maior eficiência foi encontrada nos protocolo simultâneo e pré+simultâneo. Assim, nossos dados sugerem que a BG pode estar atuando por se ligar ao composto, ou pela captura dos radicais livres produzidos durante a sua ativação. Por outro lado, os resultados no pré-tratamento também sugerem a possibilidade de que a BG estaria

modulando o metabolismo celular, como por exemplo atuando na inibição de enzimas de fase I, diminuindo, assim, a formação de compostos reativos.

Introdução

Nos últimos anos vem sendo sugerido que a utilização diária, de produtos com atividades antimutagênica e anticarcinogênica, pode ser um meio eficaz na prevenção do câncer. Este tipo de abordagem é conhecida como quimioprevenção (Kassie et al., 2002, Majer et al., 2005).

Na dieta, diversos produtos ou compostos de diferentes origens (ex: cereais, fungos) têm sido encontrados contendo propriedades quimiopreventivas. Dentre estes, destaca-se o cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Ab). Este cogumelo, nativo do Brasil, é popularmente consumido na forma de chá. O Ab é utilizado na medicina popular para combater o estresse, estimular o sistema imune, melhorar a qualidade de vida de diabéticos, reduzir colesterol, combater a osteoporose e diversos outros benefícios. Devido as suas atividades biológicas, ele vem sendo muito estudado quanto ao seu potencial nutracêutico e também como suplemento medicinal. Os constituintes de seu corpo de frutificação consistem em esteróides (Kawagishi et al, 1988), lipídios (Takaku et al, 2001), complexos protéicos (Ito et al, 1997; Fujymia et al, 1998) e polissacarídeos (Kawagishi et al, 1988; 1989; Mizuno et al, 1990). Dos compostos isolados, os polissacarídeos do tipo β -glucana (BG) vem atraindo a atenção, devido a sua atividade antitumoral (Mizuno et al, 1990), antiproliferativa (Kobayashi et al, 2005) antigenotóxica e antioxidante (Angeli et al, 2006; Chovartovicova et al, 1999), antimutagênica (Chovartovicova et al, 1999; Krizkova et al, 2001; Oliveira et al, 2006), antiviral (Liu et al, 1997), capacidade de aumentar a expressão de c-Jun/AP1 (fatores de transcrição) em células de câncer de mama (Talorete et al, 2002), entre outras.

Estas BG são polissacarídeos compostos por unidades D-glucopyranosyl e são encontradas em diversos organismos (líquens, bactérias, fungos, leveduras, cereais entre outros). A macroestrutura da BG depende tanto da fonte como do método de extração (Zekovic et al., 2005). A BG extraída do cogumelo *Agaricus blazei* apresenta uma estrutura constituída de uma cadeia principal de D-glucose com ligações $\beta(1-3)$ e $\beta(1-6)$ (Fig. 1).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antígeno-tóxico e antimutagênico da molécula de BG extraída de *Agaricus blazei* contra os danos induzidos pelo pró-carcinógeno Benzo[a]pireno O B[a]P é um representante do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo encontrado no ar e na alimentação humana (formado no preparo de carnes). Utilizamos a linhagem hepática humana HepG2 e os parâmetros utilizados para avaliação foram o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese e o teste do cometa.

2. Material e Métodos

2.1. Extração da BG de Agaricus blazei

Os polissacarídeos foram preparados de um solução aquosa do cogumelo a 5% (m/v), a qual foi aquecida por 5 horas, resultando na acidificação do meio (pH 5). O material foi isolado da solução após neutralização com 0,1 mol/L NaOH, seguido de adição de 1% (m/v) NaCl (aonde, *m* é a massa de NaCl e *v* o volume do extrato) e precipitado em etanol (1:5 v/v extrato-etanol). O precipitado foi separado por centrifugação com solução de etanol-peróxido de hidrogênio (1:1 v/v). Devido a solubilização parcial do material, este foi submetido a uma segunda extração usando

etanol (4:1 v/v etanol–meio clareador). A porção solúvel em água, foi liofilizada. Caracterização estrutural foi feita por FTIR, ¹³C NMR e ¹H NMR espectroscopia, demonstrando um complexo de β-glucana – proteína (Gonzaga et al., 2005a). Desta fração, a β –glucana foi isolada baseando-se no procedimento descrito por Yoshioka et al. (1985). A suspensão foi colocada em um shaker (15h) e centrifugado (6000 rpm/60 min). O precipitado foi lavado com solução de thymol em NaCl e dializado em água. O precipitado foi secado com banho de areia (45°C). A estrutura purificada da β-glucana foi confirmada por ¹H, 2D-COSY, HMQC and ¹³C NMR espectroscopia (Gonzaga et al., 2005 b).

2.2. Indutor de dano

O carcinógeno de ação indireta benzo[a]pyrene (Fluka) foi diluído em DMSO (JT Baker), e utilizado na concentração de 20μM, para indução de dano (concentração estabelecida em experimentos piloto). A concentração final em cultura do DMSO não ultrapassou 1%.

2.3. Linhagem HepG2 e protocolos experimentais

A linhagem HepG2 foi gentilmente cedido pelo Dr. Sigfried Knasmuller do Instituto de Pesquisa do Câncer, Universidade de Viena, Áustria. Os estoques celulares foram mantidos em freezer –80°C, em soro bovino fetal + 10% DMSO.

As culturas foram mantidas de acordo com o protocolo proposto por Uhl et al (1999). As células foram cultivadas em frascos de cultura (TPP) de 75cm², em meio MEM suplementado com 15% de soro bovino fetal, em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, até atingirem confluência. Após esse período, as culturas foram tripsinizadas (0,1%) e semeadas 2x10⁵ células/poços em placas de 24 poços, e incubadas por mais 24 horas quando, então, foram realizados os tratamentos.

No tratamento simultâneo as células foram expostas a 3 diferentes concentrações de BG (7, 21 e 63µg/mL de meio de cultura (definidas por experimentos piloto) para os testes de antigenotoxicidade e antimutagenicidade. Para o tratamento simultâneo, as células foram expostas a BG e ao B[a]P simultaneamente por 24 horas. No pré-tratamento as células foram expostas por 24 horas a BG, seguido de troca de meio de cultura e adição de B[a]P por mais 24 horas.

No pré-tratamento+simultâneo as células foram expostas por 24 horas à BG, seguido de troca do meio e adição às células de meio com B[a]P. Diferente do pré-tratamento, juntamente com o B[a]P foi adicionado novamente BG a cultura..

2.5. Ensaio do Cometa (SCGE)

Para o ensaio do cometa foi utilizado o protocolo proposto por Uhl et al., (1999,2000) de acordo com as premissas propostas por Tice et al. Resumidamente, ao final dos tratamentos as células foram tripsinizadas (0,1% por 5min), transferidas para lâminas previamente gelatinizadas e lisadas. Após eletroforese (25V, 300mA) as células foram coradas com brometo de etídio (10µg/mL – Sigma) e analisadas em microscópio ótico de fluorescência (Nikon, modelo 027012).

Para cada tratamento foram realizadas 3 repetições independentes. Para o ensaio do cometa foram analisadas 100 células visualmente (Kobayashi et al., 1995), e

classificadas de acordo com o seguinte critério: (classe 0) células com dano indetectável, que não apresentavam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do núcleo; (classe 2) células com cauda entre 1 a duas vezes o diâmetro do núcleo; (classe 3) células com cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Após isto era realizado a somatória dos escores, somando os valores de cada uma das 100 células, de cada tratamento. Células apoptóticas que apresentaram o núcleo totalmente fragmentado não foram levadas em consideração na análise (Speit and Hartmann, 2005).

2.5.1. Viabilidade celular

Paralelamente ao teste do cometa, eram retirados 20µL da suspensão celular e estes eram então adicionados a 20ul de Azul de Trypan (Gibco) e homogeneizados. Após isto a solução era levada para câmara de Neubauer e era feita a contagem das células. Desta forma as células eram classificadas em células vivas (sem coloração e células mortas (coloração azul). Células com coloração intermediária eram contabilizadas e divididas por 2 e então esses valores eram adicionados ao número de células vivas e células mortas. Para o cálculo da viabilidade celular era feita a razão de células vivas pelo total de células analisadas.

2.6. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese

O teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese foi realizado de acordo com o protocolo de Darroudi and Natarajan (1991). Assim, 2.5×10^5 células foram cultivadas em frascos de 25cm² por dois dias em estufa a 5% CO₂ a 37,5°C e humidade relativa de 96%. Após dois dias de crescimento, o meio foi removido e as células foram

expostas aos compostos ou ao solvente (DMSO – controle negativo) e a diferentes protocolos de tratamento. Em todos os casos as células foram expostas por 24 horas aos compostos testados. Para a obtenção de células binucleadas, as células tratadas eram lavadas e citocalasina-B (3µg/mL - Sigma) era adicionada. As células eram então colhidas após 28 horas de exposição a citocalasina-B, tratadas com citrato de sódio gelado (1%) e centrifugadas (800 rpm por 8 min). Fixador metanol/ácido acético (3/1) juntamente com 1 gota de formol era adicionado ao *pellet*. Este processo de fixação era então realizado 3x. Para a detecção dos micronúcleos as células foram coradas com Giemsa (5%). Para cada citotóxicos na determinação de micronúcleos, o índice de divisão nuclear (NDI) foi calculado, contabilizando o numero de células binucleadas em 1000 células, e dividindo estas por 100 (Eastmond and Tucker, 1989)

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico Prism 4.0. Para o teste do cometa foi realizada o teste de Mann-Whitney, para verificar diferenças entre os tratamentos. Para o teste do micronúcleo, foi realizada ANOVA seguida do teste de múltiplas comparações de Dunnetts (todos com um limite de 5%).

3. Resultados

Os resultados dos experimentos do cometa e micronúcleo para a investigação da ação genotóxica e mutagênica da BG, estão apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Não foi observado aumento na migração de fragmentos de DNA e tão pouco alteração na viabilidade celular (Fig. 2) no ensaio do cometa. No caso do teste do micronúcleo também não houve aumento na formação de micronúcleos, e nem atraso no ciclo celular como demonstrado pelo índice de divisão nuclear (Fig. 3).

As Figuras 4 e 5 representam a associação das 3 concentrações de BG com o agente indutor de dano B[a]P, no tratamento do tipo simultâneo, no ensaio do cometa e micronúcleo, respectivamente. Em ambos os testes, as 3 concentrações testadas de BG demonstraram um efeito protetor efetivo, com uma relação de dose resposta. Isto fica bem evidenciado uma vez que o escore médio do teste do cometa para o B[a]P foi de aproximadamente 120 unidades arbitrárias e na maior concentração utilizada de BG associada ao B[a]P esse valor caiu para aproximadamente 65 unidades arbitrárias. Resultados semelhantes foram obtidos no teste do micronúcleo, onde o B[a]P sozinho induziu uma frequência de micronúcleos superior a 50 e, quando associado a maior concentração de BG, essa frequência caiu para aproximadamente 35.

No caso do pré-tratamento (Fig. 6 e 7), resultados um pouco diferentes foram obtidos, uma vez que em ambos os testes apenas a maior concentração de BG foi efetiva para a redução de danos. No teste do cometa o escore do controle positivo foi de aproximadamente 150 unidades arbitrárias e, quando associado a maior concentração de BG esse caiu para um escore de aproximadamente 120 (as outras duas concentrações não diferiram do controle positivo). Resultados semelhantes foram obtidos no teste do micronúcleo, onde somente a maior concentração protegeu contra os danos induzidos pelo B[a]P (Fig. 7). No controle positivo obteve-se uma frequência média de micronúcleos aproximadamente de 47 contra 35 na associação com BG.

Por último, e de modo que se pudesse avaliar a ocorrência de um efeito aditivo do tratamento simultâneo e o pré-tratamento, foi realizado um tratamento onde as células foram pré-tratadas com as BG, porém este tratamento continuou no meio quando o B[a]P foi adicionado. Pode-se observar que houve uma diminuição tanto na migração do DNA (Fig. 8) como na formação de micronúcleos (Fig. 9), uma vez que o escore do cometa no B[a]P foi aproximadamente 115 unidades arbitrárias e, quando associado a

maior concentração, este caiu para aproximadamente 55. O mesmo ocorreu para o teste do micronúcleo, onde no controle positivo obteve-se uma média de micronúcleos de aproximadamente 55 e, quando associado a maior concentração de BG, este caiu para 25, aproximadamente. Nesta nota-se que houve um decréscimo nas frequências de micronúcleos, e estas foram inferiores ao controle negativo).

4. Discussão

Diversos compostos da dieta têm demonstrado potencial anticarcinogênico e antimutagênico atuando através de diferentes mecanismos, como inibição de enzimas de fase I (família das CYP 450), ativação de enzimas de fase II (família das GSTs), indução de apoptose e proteção contra radicais livres, sendo estes os principais mecanismos. Estimulação do reparo de DNA, efeitos imunoestimulantes, inibição de ciclooxigenase, restrição calórica e diminuição do trânsito de mutágenos no trato gastrointestinal, também são alguns dos mecanismos pelos quais alguns alimentos podem exercer seu efeito protetor (Ferrari and Torres, 2003).

Os dados obtidos no presente estudo mostram que BG não induziu nenhum efeito danoso ao material genético, e que esta apresentou um importante efeito protetor contra um agente mutagênico que pode estar presente na dieta do homem, dependendo do seu hábito alimentar. Observou-se também que a BG revelou um maior efeito protetor quando em tratamento simultâneo, o que poderia estar indicando que esta estaria se ligando diretamente ao B[a]P, uma vez que é sabido que certas fibras alimentares tem a capacidade de se ligar a compostos aromáticos (Ferguson et al, 1993; Williams et al, 1999). Entretanto, não se pode excluir o fato de que as BG podem atuar

como um “scavenger” de radicais livres (Angeli et al, 2006; Chovartovicova et al, 1999), podendo se ligar aos radicais livres produzidos pela ativação do B[a]P, uma vez que a ativação destes compostos, pelas enzimas da família das P450, gera radicais livres que podem interagir de forma nociva com o DNA (Briede et al, 2004).

Outro fato que nos chama a atenção é que a BG apresentou um efeito protetor quando em pré-tratamento, o que nos indica que estas poderiam estar atuando através da modulação de enzimas, como já sugerido por outro trabalho do nosso grupo (Angeli et al., 2006). Assim, estes dados reforçam essa hipótese, uma vez que este tipo de protocolo de tratamento nos indica a possibilidade de alteração na expressão e ou atividade de algumas enzimas. Essa atuação poderia ser através de receptores na membrana da célula ativando vias de sinalização, expressão de fatores de transcrição e, conseqüentemente, modulando a expressão gênica. Isto é corroborado com o fato de outros trabalhos demonstrarem que polissacarídeos extraídos dos cogumelos *Lentinulas edodes* e *Agaricus blazei* apresentaram um efeito inibitório *in vivo*, na expressão de isoenzimas da família P450 1A (Hashimoto et al, 2002; Okamoto et al, 2004), que catalisam a primeira etapa na formação do metabólito reativo do B[a]P.

Quando comparados, os protocolos pré+simultâneo com o simultâneo, observa-se que existe diferença estatística significativa entre eles, comprovando um maior efeito protetor quando as células foram expostas por 24 horas sem a presença do B[a]P, evidenciando um efeito aditivo. Desta maneira, o maior efeito protetor observado no tratamento pré+simultâneo poderia ser explicado, uma vez que a molécula de BG poderia estar tanto inibindo enzimas da família P450 como também seqüestrando espécies reativas de oxigênio que estariam sendo formadas na ativação do B[a]P, ou mesmo se ligando diretamente à este impedindo que o mesmo entrasse dentro da célula e sofresse metabolização.

Tomados como um todo, os resultados deste estudo permitem constatar que o polissacarídeo BG extraído do cogumelo *Agaricus blazei* protegeu células hepáticas derivadas de humanos dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do B[a]P, um composto carcinogênico encontrado comumente no meio ambiente (IARC 1983). Este fato, nos indicam que as BGs poderiam estar amenizando os efeitos deletérios deste composto, em situações reais de exposição do ser humano, funcionando, desta maneira, como um agente quimiopreventivo, as quais poderiam ser incluídas na dieta de seres humanos. Outro dado interessante do presente estudo é a possibilidade da modulação de enzimas de fase I pela BG, tornando-a um interessante agente coadjuvante na quimioterapia. De acordo com Walter-Sack and Klotz (1996) a inibição de enzimas CYP 450 torna a quimioterapia mais eficaz, uma vez que o quimioterápico demorara mais tempo para ser excretado.

Referencias:

Angeli, J.P.F., Ribeiro, L.R., Gonzaga, M.L.C., Soares de S. A., Ricardo, M.P.S.N., Tsuboy, M.S., Stidl, R., Knasmuller, S., Linhares R. E., Mantovani, M.S., 2006. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. Cell biology and toxicology 22, 285-291.

- Briede, J.J., Godschalk, R.W., Emans, M.T., De Kok, T.M., Van Maanen, J., Van Schooten, F.J., Kleinjans, J.C., 2004. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radical Research* 38, 995-1002.
- Darroudi, F., Natarajan, A.T., 1991. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens /carcinogens. *Mutagenesis* 6, 339–403.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., 1989. Kinetochores localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research* 224, 517-525.
- Ferguson, L.R., Robertson A.M, Watson, M.E., Kestell, P., Harris, P.J., 1993. The adsorption of a range of dietary carcinogens by alpha-cellulose, a model insoluble dietary fiber. *Mutation Research* 319, 257–66.
- Ferrari, C.K.B. and Torres, E.A.F.S., 2003. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacother* 57, 251–260.
- Fujimiya, Y., Suzuki, T., Oshiman, K., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T., Katakura, R., 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from Basidiomycetes, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation apoptosis. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 46, 147-159.

- Gonzaga, M.L.C., Ricardo, N.M.P.S., Heatley, F., Soares, S. de A., 2005a. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrates Polymers* 60, 43–49.
- Gonzaga, M.L.C., Menezes, T.M.F., Ricardo, N.M.P.S., Sandra, A.S., 2005b. Isolation, characterization and evaluation of the capacity of solubilization of drugs of isolated polysaccharides from mushroom *Agaricus blazei* Murill. Presented at the 8th Brazilian Polymer Congress, Aguas de Lindoia, Sao Paulo. Proceedings in CD Rom.
- Hashimoto, T., Nonaka, Y., Minato, K., 2002. Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei*, on the expression of cytochrome P450s in mice. *Biosciences Biotechnology Biochemistry* 344, 610–1614.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1983. Polynuclear aromatic compounds. General remarks on the substances considered. IARC 32, 33-91.
- Ito, H., Shimura, K., Itoh, H., Kawade, M., 1997. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumour-bearing mice. *Anticancer Research* 17, 277-284.

- Kassie, F., Rabot S., Uhl M., Huber W., Qin M. H., Helma C., Schulte-Hermann R., Knasmüller S., 2002. Chemoprotective effects of garden cress (*Lepidium sativum*) and its constituents towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxic effects and colonic preneoplastic lesions. *Carcinogenesis* 23, 1155-1161.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1989. Fractionation and antitumour activity of the water insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research* 186, 267-273.
- Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1988. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry* 27, 2777-2779.
- Kawagishi, H., Normura, A., Yumen, T., Mizuno, T., 1988. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydrate Research* 183, 150-154.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between the manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS communication* 3, 103-115.
- Kobayashi, H., Yoshida, R., Kanada, Y., Fukuda, Y., Yagyu, T., Inagaki, K., Kondo, T., Kurita, N., Suzuki, M., Kanayama, N., Terano, T., 2005. Suppressing effect of

daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 131, 527-538.

Majer, B. J., Hofer, E., Cavin, C., Lhoste, E., Uhl, M., Glatt, H. R., Meinel, W., Knasmüller, S., 2005. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food and Chemical Toxicology* 43, 433-441.

Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., 1990. Antitumour activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agriculture and Biological Chemistry* 54, 2889-2896.

Okamoto, T., Kodoi, R., Nonaka, Y., 2004. Lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) suppresses expression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. *Biofactors* 21, 407– 374.

Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods in Molecular Biology* 291, 85-95.

Takaku, T., Kimura, T., Okuda, H., 2001. Isolation of an antitumour compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *Journal of Nutrition* 131, 1409- 1413.

- Talorete, T.P.N., Isoda, H., Maekawa, T., 2002. *Agaricus blazei* (class Basidiomycotina) aqueous extract enhances the expression of c-Jun protein in MCF7 cell. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 5162-5166.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 1999. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutat. Res.* 441, 215-224.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat. Res.* 468, 213-225.
- Walter-Sack, I., and Klotz, U., 1996. Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clinical Pharmacokinetics* 31, 47-64.
- Williams, G.M., Williams, C.M., Weisburger, J.H., 1999. Diet and cancer prevention: the fiber first diet. *Toxicological Sciences* 52, 72-86.

Yoshioka, Y., Tabet, R., Saito, H., Uehara, N., Fukuoka, F., 1985. Antitumor polysaccharide from *P. ostreatus* (FR.) QUÉL.: Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research* 140, 93–100.

Zekovic, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvic M. M., Jakovljevic, D., Moran, C. A., 2005. Natural and modified (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Review in Biotechnology* 25, 205-230.

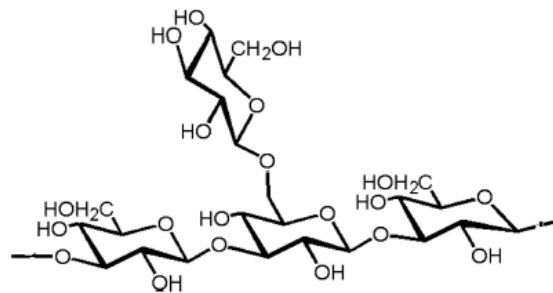


Figura 1: Estrutura de β -glucana extraída de *Agaricus blazei*, mostrando ligações β (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)

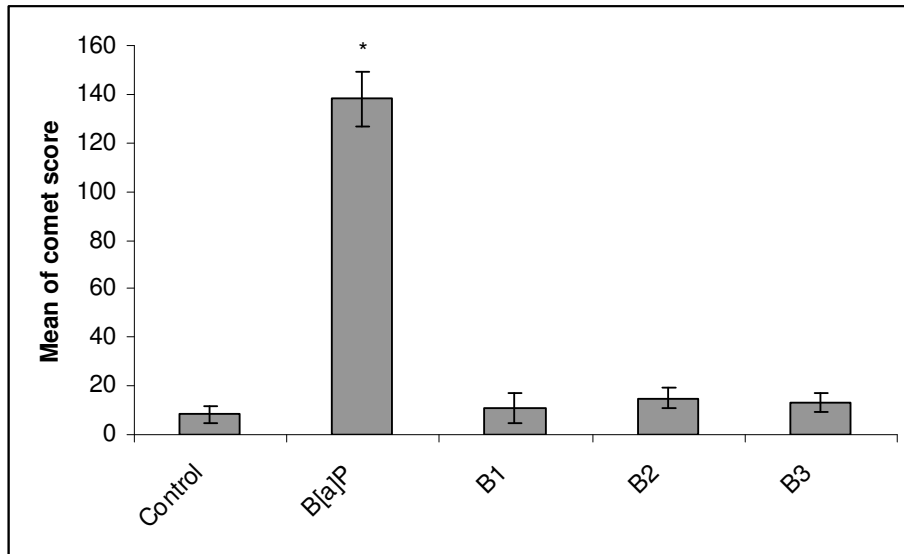


Figura 2: Barras representando o escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis*. Control (DMSO-1%); B[a]P - 20 μ g/mL; B1 - BG 7 μ g/mL; B2 - BG 21 μ g/mL; B3 - BG 63 μ g/mL(*) estatisticamente significante do controle ($p > 0.05$)

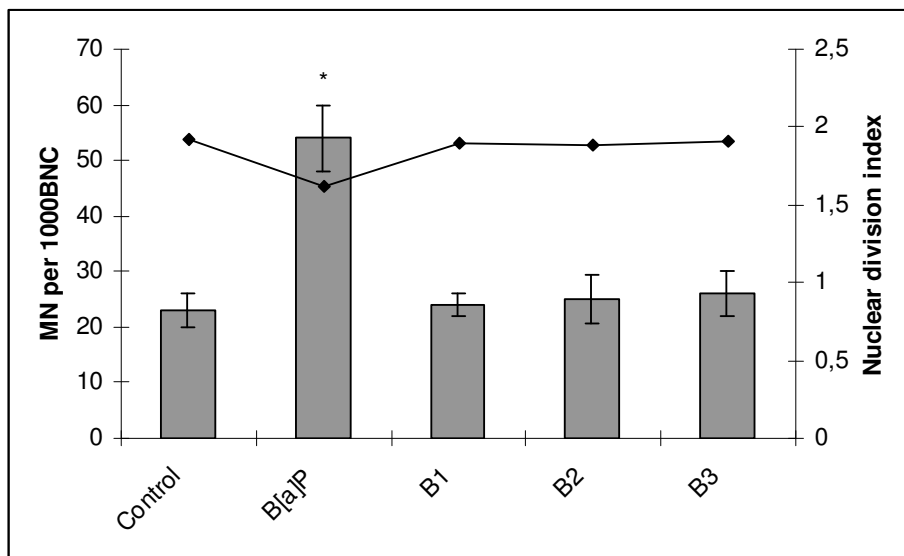


Figura 3: Barras representando numero de micronúcleo em 1000 células binucleadas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis*, em tratamento simultâneo simples. Linha representando o índice de divisão nuclear. B[a]P - Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 7 μ g/mL; B2 - BG 21 μ g/mL; B3 - BG 63 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p > 0.05$).

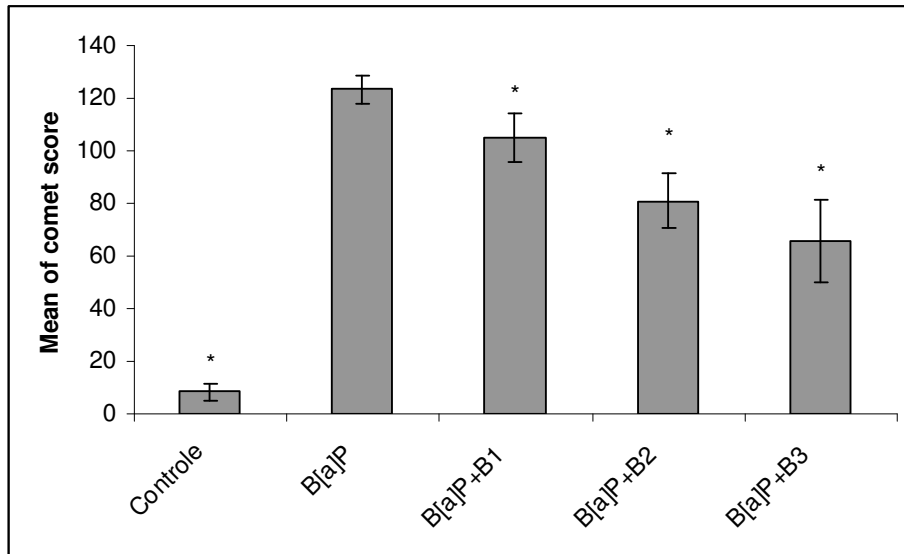


Figura 4: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis* associada ao B[a]P, em tratamento simultâneo. B[a]P – Benzo[a]pireno 20µg/mL; B1 - BG 7µg/mL; B2 – BG 21µg/mL; B3 – BG 63µg/mL. (*) estatisticamente significativa do B[a]P ($p > 0.05$).

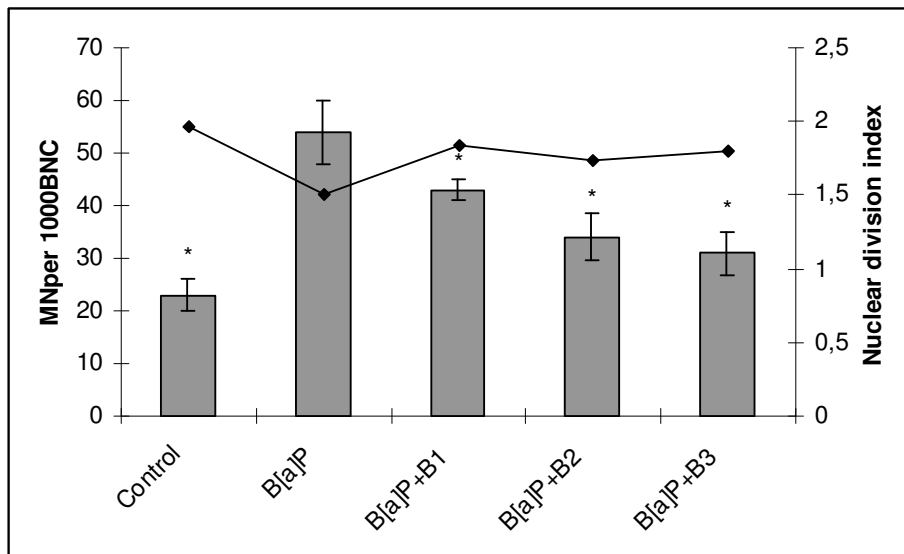


Figura 5: Barras representando número de micronúcleos em 1000 células binucleadas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis* associada ao B[a]P, em tratamento simultâneo. Linha representando o índice de divisão nuclear. B[a]P – Benzo[a]pireno 20µg/mL; B1 - BG 7µg/mL; B2 – BG 21µg/mL; B3 – BG 63µg/mL. (*) estatisticamente significativa do B[a]P ($p > 0.05$).

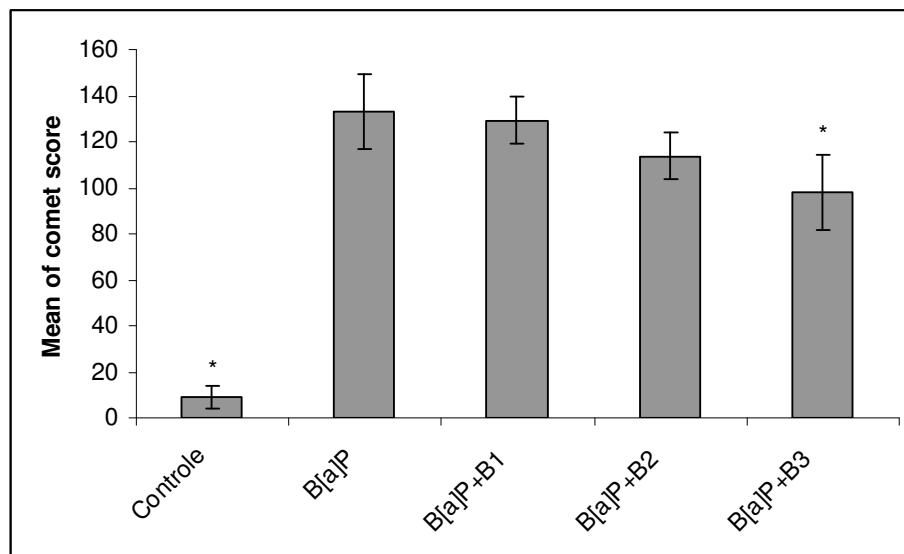


Figura 6: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis* associada ao B[a]P, em pré-tratamento. B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 7 μ g/mL; B2 – BG 21 μ g/mL; B3 – BG 63 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p>0.05$).

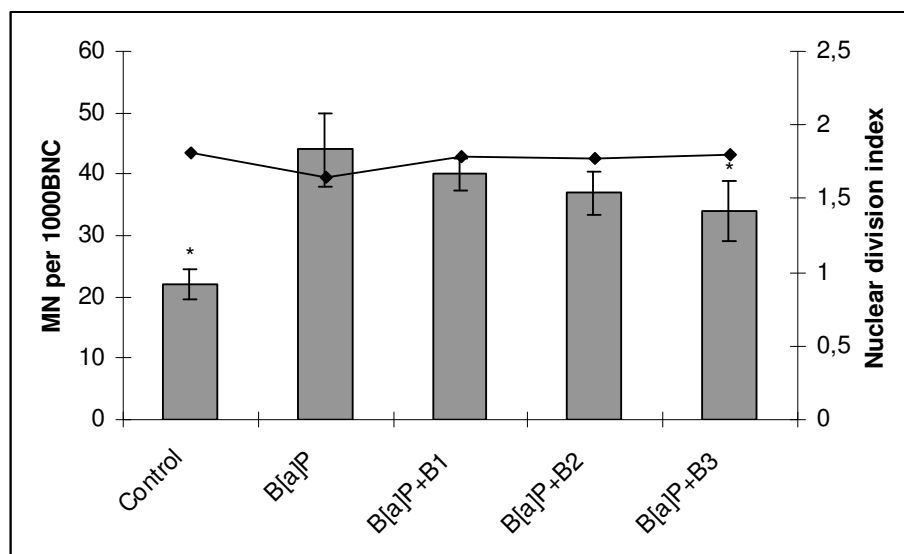


Figura 7: Barras representando numero de micronúcleos em 1000 células binucleadas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis* associada ao B[a]P, em pré-tratamento. Linha representando o índice de divisão nuclear. B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 7 μ g/mL; B2 – BG 21 μ g/mL; B3 – BG 63 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p>0.05$).

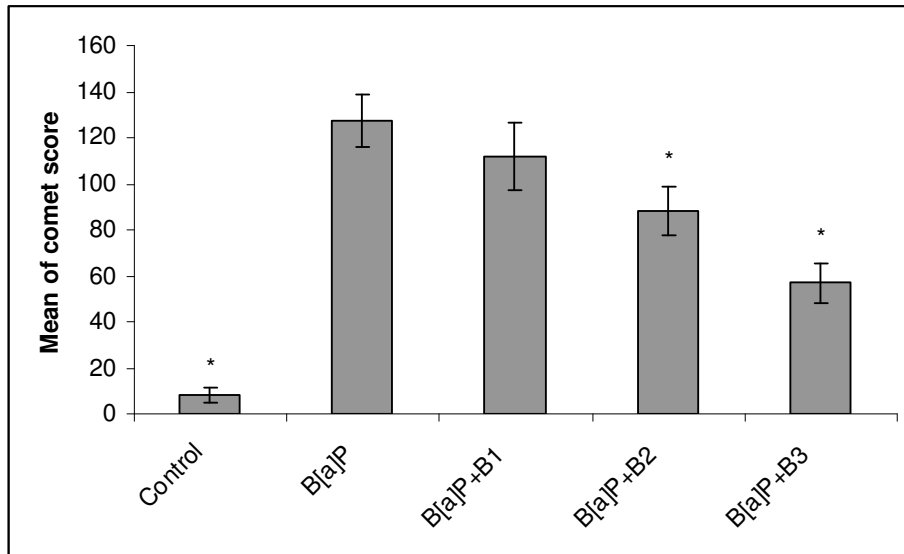


Figura 8: Barras representando escore médio dos cometas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis* associada ao B[a]P, em pré-tratamento+simultâneo. B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 7 μ g/mL; B2 – BG 21 μ g/mL; B3 – BG 63 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p > 0.05$).

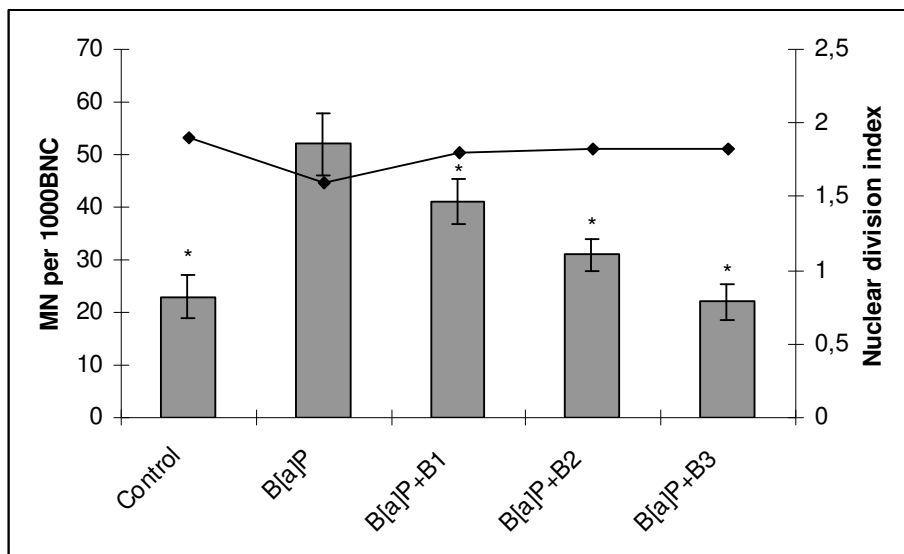


Figura 9 : Barras representando numero de micronúcleos em 1000 células binucleadas, no tratamento da linhagem HepG2 com diferentes concentrações de Beta-glucana extraída de *Agaricus brasiliensis* associada ao B[a]P, em pré-tratamento+simultâneo. Linha representando o índice de divisão nuclear. B[a]P – Benzo[a]pireno 20 μ g/mL; B1 - BG 7 μ g/mL; B2 – BG 21 μ g/mL; B3 – BG 63 μ g/mL. (*) estatisticamente significante do B[a]P ($p > 0.05$).

Artigo 5

Artigo a ser submetido ao periódico “Food and Chemical Toxicology”

Avaliação do efeito genotóxico e/ou antigenotóxico de polissacarídeos extraídos de diferentes fases de maturação do cogumelo medicinal *Agaricus brasiliensis*

J.P.F. Angeli ^a; L.R. Ribeiro ^b; C. M. Camellini ^c; M.S. Mantovani ^{a*}

a) Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; b) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Depto. de Biologia, UNESP Rio Claro, SP, Brazil e Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; c) Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Resumo

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei*) tem recebido muita atenção devido a suas propriedades medicinais. Entre os compostos isolados deste, destacam-se as β -glucanas (BG) que são polissacarídeos de parede celular. O objetivo do presente estudo foi de estudar, o efeito genotóxico e/ou antigenotóxico de polissacarídeos totais do cogumelo e de BGs, ambos extraídos em diferentes fases de maturação (imaturo, maduro não esporulado e maduro esporulado). Para testar a genotoxicidade da BG, foi utilizado o teste do cometa na linhagem HepG2. Adicionalmente, para testar o efeito protetor, foi associado à BG ao H₂O₂, bleomicina e doxorubicina. Os resultados demonstraram que os polissacarídeos e as BGs não demonstraram efeito genotóxico, pelo contrário, protegeram contra os danos causados pelos 3 indutores. Somente o

polissacarídeo total não apresentou efeito protetor contra a doxorubicina. De forma interessante o maior efeito protetor foi evidenciado nos estágios mais maduros e na substância BG isolada.

1. Introdução

Estudos epidemiológicos têm apresentado evidências que o surgimento de cânceres em diversos órgãos como estômago, cólon, próstata, mama, estão relacionados a dietas inapropriadas (WCFR/IARC, 1997). O principal fator, envolvido nesses processos, está relacionado ao aumento da taxa de mutação. Assim, sugere-se que uma diminuição na taxa de mutações em um organismo estaria diretamente relacionada ao retardo no surgimento destas neoplasias (Loeb et al., 2003). Desta forma, torna-se desejável a introdução de compostos antimutagênicos na dieta do ser humano.

Entre os alimentos que vem recebendo atenção quanto a suas propriedades antimutagênicas, encontram-se diversos cogumelos medicinais, destacando-se entre eles o cogumelo *Agaricus brasiliensis* Wasser (= *Agaricus blazei*). Este é um cogumelo nativo do Brasil, sendo bastante estudado devido, as suas propriedades medicinais como estimulante do sistema imune, propriedade anticancerígena, antimutagênica e antioxidante (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990, Ohno et al., 2001, Dong et al., 2002,).

Dentre os compostos isolados do cogumelo *Agaricus brasiliensis*, destacam-se alguns polissacarídeos com atividade antitumoral, entre esses polissacarídeos muita atenção tem sido dada as β -Glucanas (BGs), sendo essas as principais responsáveis pelos efeitos antitumorais do cogumelo (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990, Ohno et al., 2001). Recentemente alguns trabalhos nossos e de outros grupos têm

relatado efeito antimutagênico para BG extraídas de *Agaricus brasiliensis* (Angeli et al., 2006) e também para BGs de diferentes origens, porém de mesma estrutura química (Chovartovicova et al., 1993; Lazarova et al., 2004; Krizkova et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Grande parte deste efeito protetor deve-se em parte a sua função antioxidante, assim acredita-se que este composto possa ser utilizado como quimiopreventivo, inibindo a ação genotóxica de alguns compostos.

Vale ressaltar, ao se extrair a BG do cogumelo, que a fase de desenvolvimento do corpo de frutificação cogumelo pode influenciar no conteúdo e tipo de BG encontradas, fazendo com que possa haver uma grande diferença nas respostas biológicas encontradas (Camelini et al., 2005).

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e ou antigenotóxicos dos polissacarídeos totais extraídos em três diferentes fases de desenvolvimento do cogumelo (imaturo – SIIa; maduro não esporulado – SIIIa; e maduro esporulado - SIIIb), sendo também avaliado as BGs totais extraídas nas 3 diferentes fases (imaturo – SIIb; maduro não esporulado – SIIIb; e maduro esporulado – SIIIb), desta forma permitindo dizer qual a melhor forma de suplementação com finalidade antioxidante. Também podem auxiliar na indicação de qual a melhor fase para a colheita do cogumelo para fins nutracêuticos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Extração da fração polissacarídica

Polissacarídeos da parede celular foram extraídos e purificados de acordo com o protocolo proposto por Mizuno et al. (1990). Amostras secas do corpo de frutificação do

A. brasiliensis (20 g) foram depositados, lavados com 120 ml 85% (v/v) etanol e filtrado. Os resíduos foram lavados com 350 ml 85% (v/v) etanol aquecido a 80 °C por 3 h (3 vezes). Os polissacarídeos foram em seqüência extraídos com 350 mL água aquecida a 100 °C por 3 h (3 vezes). Estas frações aquosas foram coletadas por filtração, seguido de adição de 4 vol. 95% (v/v) etanol. A mistura, foi então deixada overnight de forma a obter a fração de polissacarídeos, que foi concentrada e dializada em água destilada. Essa fração foi então secada a frio, pesada e analisada. Nestas frações então foram observadas polissacarídeos com ligações do tipo α (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) e também β (1 \rightarrow 2),(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6), sendo que os polissacarídeo de ligações β constituíam aproximadamente 70% do total de polissacarídeos.

2.2 Purificação dos polissacarídeos

Cada amostra (1 g) foi dissolvida em água destilada e passada através de uma coluna cromatográfica de DEAE-celulose (2 cm largura X 35 cm comprimento). A fração neutra eluída com água (105 mL) foi descartada, as frações selecionadas de 0,25, 0,5 e 0,75 M NaCl (105 mL cada) foram concentradas e dializadas extensivamente. O polissacarídeo foi fracionado de acordo com o maior peso molecular, em uma coluna Toyopear HW-65F (Tosoh) (2 cm largura X 35 cm comprimento) selecionando os primeiros 35 mL eluídos. As BGs (não absorvidas) foram separadas usando uma coluna Con A-Sepharose 4B (Fluka Biochemika) (1,5 cm largura X 10 cm comprimento), secadas a seco, pesadas e analisadas. Nestas frações então foram observadas polissacarídeos com ligações somente do tipo β (1 \rightarrow 2),(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). Resultados mais detalhados da análise dos polissacarídeos podem ser encontrados em maiores detalhes no trabalho previamente publicado por Camelini et al (2005).

2.3. Indutor de dano

Para a indução de danos ao DNA foram utilizados 3 compostos; H₂O₂ (100µM - Nova Química), Bleomicina (0,5µg/mL - Sigma) e Doxorubicina (1µg/mL - Fluka), todos os compostos foram diluídos em PBS livre de Ca e Mg.

2.5. Linhagem HepG2 e protocolos experimentais

A linhagem celular HepG2 foi gentilmente cedida pelo Dr Sigfried Knasmuller (Institute of Cancer Research - Medical University of Vienna). As células foram estocadas em nitrogênio líquido e cultivadas com meio Minimal essential medium (MEM), suplementado com 15% de soro bovino fetal, ambos da Gibco (Paisely - Scotland), e 1% penicilina/estreptomicina em frascos de 75cm² (TPP). Nessas condições, o ciclo celular é de aproximadamente de 24 horas.

No protocolo de genotoxicidade as células foram expostas a 3 diferentes concentrações (5, 15 e 45µg/mL de meio de cultura) do polissacarídeo em suas diferentes fases de maturação por 24 horas (concentrações definidas por experimentos piloto).

Para os tratamentos de antígenotoxicidade, as células foram expostas simultaneamente aos polissacarídeos e a um dos diferentes indutores de dano, por 3 horas no caso da bleomicina e doxorubicina e 5 minutos no gelo para o H₂O₂.

2.6. *Single cell gel electrophoresis (SCGE)*

Para o ensaio do cometa foi utilizado o protocolo proposto por Uhl et al., (1999,2000) de acordo com as premissas propostas por Tice et al (2003). Resumidamente, ao final dos tratamentos as células foram tripsinizadas (0,1% por 5min), transferidas para lâminas previamente gelatinizadas e lisadas. Após eletroforese (25V, 300mA) as células foram coradas com brometo de etídio (10µg/mL – Sigma) e analisadas em microscópio ótico de fluorescência (Nikon, modelo 027012).

Para cada tratamento foram realizadas três repetições independentes. Para o ensaio do cometa foram analisadas 100 células, visualmente (Kobayashi et al., 1995), e classificadas de acordo com o seguinte critério: (classe 0) células com dano indetectável, que não apresentavam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do núcleo; (classe 2) células com cauda entre 1 a duas vezes o diâmetro do núcleo; (classe 3) células com cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Após isto o valor de cada célula era somado para obter o score (variável de 0 a 300), após isto era calculado a media e os desvios de cada tratamento. Células apoptóticas que apresentaram o núcleo totalmente fragmentado não foram levadas em consideração na análise (Speit and Hartmann, 2005). Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico Prism 4.0 realizando o teste de Mann-Whytney, para verificar diferenças entre os tratamentos.

2. Resultados

Para os protocolos de genotoxicidade, demonstra-se na figura 1 o resultado dos polissacarídeos totais extraídos nas diferentes fases de maturação do cogumelo. Não houve alteração na viabilidade celular (resultados não apresentados – considerando viabilidade ótima acima de 80%), e tão pouco na migração de fragmentos de DNA

como observado pelo teste do cometa. O mesmo pode ser observado na Figura 2, onde apresentam-se os resultados apenas das BGs. De forma semelhante, variações na viabilidade celular (não apresentados) e migração de DNA não foram evidenciadas.

Para os protocolos de antigenotoxicidade, associou-se as BGs a 3 indutores de dano. Primeiro, na Figura 3, estão apresentados os resultados das associações com o H_2O_2 . Neste caso observa-se que houve um efeito protetor em praticamente todas as concentrações, sendo que os menores efeitos protetores são observados no polissacarídeo bruto na fase jovem (SIa), e os maiores efeitos são evidenciados na fração contendo apenas BG na fase madura esporulada (SIIB e SIIIB). Padrão de resposta semelhante é visto no tratamento com bleomicina (Figura 4), havendo efeito protetor em quase todas as concentrações testadas e da mesma forma, reduzido efeito protetor é encontrado no polissacarídeo bruto na fase jovem e um efeito pronunciado na fração contendo apenas BG na fase madura.

Diferente dos tratamentos com H_2O_2 e bleomicina, a associação das diferentes frações do cogumelo com a doxorubicina apresentou efeito protetor somente nas frações purificadas (SIB, SIIb e SIIIb), sendo que a fração de polissacarídeos totais demonstrou apenas um fraco efeito protetor na maior concentração da fase madura esporulada (SIIIa).

3. Discussão

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse na descoberta de alimentos e compostos alimentares que tenha a capacidade de prevenir danos ao material genético, desta forma atuando como compostos quimioprotetores. O uso racional de

quimioprotetores baseia-se na identificação do mesmo como eficiente, e também no entendimento do seu mecanismo de ação (Miadokova et al., 2006). Diversos mecanismos como inibição de efeitos genotóxicos, captura de radicais livres, inibição de crescimento tumoral e modulação da tradução de sinais podem estar envolvidas (De Flora et al., 2005; Miadokova et al., 2004). Desta forma foi realizado neste trabalho a associação dos polissacarídeos totais e as BGs isoladas do cogumelo *A. Brasiliensis*, contra três agentes sabidamente formadores de ROS (espécies reativas de oxigênio), de forma a reforçar a hipótese de antioxidante e também verificar se as fases de colheita do cogumelo que afetam a seus compostos bioativos, uma vez que não existem trabalhos na literatura relacionando estágios de maturação, presença de BG e efeito protetor no material genético.

No presente trabalho observou-se a ausência de efeito genotóxico dos polissacarídeos totais (aonde há presença de ligações do tipo α e β) da parede do cogumelo e também das BG. Desta forma pode-se supor que estes não apresentam efeito genotóxico se consumidos pelo homem, resultado este também demonstrado por vários trabalhos utilizando extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* e isolados de BGs (Luiz et al., 2003; Bellini et al., 2003, 2006; Guterrez et al., 2004; Angeli et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

No estudo da antígenotoxicidade, associou-se os polissacarídeos totais e as BG com o H_2O_2 , bleomicina e doxorubicina. Pode-se observar uma elevada redução dos danos causados pelo peróxido e pela bleomicina. Ao compará-los evidencia-se uma maior proteção contra o peróxido de hidrogênio, visto que a bleomicina não causa danos apenas pela formação de radicais livres, e sim também pela quebra de fita e inibição de síntese de DNA (referencia).

No caso da doxorubicina, observa-se uma fraca proteção pelos polissacarídeos totais, apenas as BG apresentaram efeito protetor. Isto pode ser explicado pelo mecanismo de ação da droga, uma vez que é sabido que a doxorubicina não causa danos apenas pela formação de radicais livres, mas também por se intercalar no DNA e inibir a topoisomerase II (referencia).

Assim, fica claro que os polissacarídeos totais apresentaram efeitos protetores menores quando comparado com as BGs purificadas, onde apenas polissacarídeos com ligações do tipo β estão presentes. Podendo-se justificar isso pela menor quantidade de BG nos extratos totais, uma vez que é sabido que esta apresenta uma importante propriedade antioxidante (Slamenova et al., 2003; Krizkova et al., 2003; Angeli et al., 2006). Entre os polissacarídeos totais, observa-se que conforme a extração é feita em fases mais maduras do cogumelo, este apresenta efeito protetor maior, isto poder ser devido a uma maior presença de ligações β (1 \rightarrow 3) e α (1 \rightarrow 4) nas BGs purificadas de estágio maduro (Camelini et al., 2005). O mesmo padrão é observado para as BG purificadas, onde uma maior quantidade de ligações β (1 \rightarrow 3) é observada conforme o estágio de maturidade do cogumelo aumenta.

Estes resultados possibilitam indicar, que apesar do cogumelo ser colhido na fase imatura para fins culinários, pois é nessa fase que este apresenta o seu maior valor comercial, este seja colhido em fases mais maduras, pois acredita-se que nestas fases o cogumelo pode expressar melhor suas propriedades bioativas, tanto antioxidantes como antitumorais. Uma vez que é sabido que suas ligações β (1 \rightarrow 3) e α (1 \rightarrow 4) estão envolvidas no seu efeito antitumoral (Mizuno et al., 1990).

De forma geral podemos sugerir o uso de BG para fins quimiopreventivos principalmente para agentes produtores de ROS, uma vez que estas apresentam baixa eficiência em relação aos demais agentes utilizados. A inclusão desse composto na

dieta, na forma de cápsulas, ou mesmo na fortificação de alimentos como pães e cereais, com o intuito de disponibilizar alimentos mais saudáveis, e possivelmente protegendo a população de doenças desencadeadas por eventos mutacionais, como é o caso do câncer, deve ser o próximo objetivo de estudo nesse campo. Uma outra possibilidade seria a introdução das BG na dieta através da produção de alimentos transgênicos.

4. Bibliografia

- Angeli, J.P.F., Ribeiro, L.R., Gonzaga, M.L.C., Soares de S. A., Ricardo, M.P.S.N., Tsuboy, M.S., Stidl, R., Knasmuller, S., Linhares R. E., Mantovani, M.S., 2006. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell biology and toxicology* 22, 285-291.
- Bellini MF, Angeli JPF, Matuo R., Terezan, AP, Ribeiro LR., Mantovani MS. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicol In Vitro*. 2006;20:355–60.
- Bellini MF, Giacomini NL, Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicol In Vitro*. 2003,17:465–9.

- Chorvatovicová, D., 1991. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co60 in mice. *Strahlenther Onkologie* 167, 612–614.
- DeFlora S, Bennicelli C, Bagnasco M. (1999) Rationale and mechanism of cancer chemoprevention. *Recent Results Cancer Res* 151, 29–44.
- Dong Q, Yao J, Yang X, Fang J (2002) Structural characterization of water-soluble b-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr. Res.* 337: 1417–1421.
- Guterrez ZR, Mantovani MS, Eira AF, Ribeiro LR, Jordao BQ. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2004;18:301–9.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T (1989) Fraction and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* 186:267–273.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between the manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS communication* 3, 103-115.

- Krizkova, L., Zitnanova, I., Mislovicova, D., Masarova, J., Sasinkova, V., Durackova, Z., Krajcovicova, J., 2006. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan–human serum albumine and mannan–penicillin G acylase. *Mutation Research* 606, 72-79.
- Lazarova M, Labaj J, Kovacikova Z, Slamenova D. Diet containing fungal (1→3)-b-glucan derivative exhibits protective effects against DNA lesions induced in freshly isolated rat cells. *Neoplasma*. 2004;51:431–5.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R., Anderson, J.P., 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 776–781.
- Luiz RC, Jordão BQ, Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murrill mushroom organic extracts in wild type CHO(k1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. *Mutat Res*. 2003;528:75–9.
- Miadoková E, Svidová S, Vlèková V, Kogan G, Rauko P. (2004) The role of microbial polysaccharides in cancer prevention and therapy. *J Cancer Integrative Med* 2, 173– 8.
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., 1990. Antitumour activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agriculture and Biological Chemistry* 54, 2889-2896.

Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T (2001) Antitumor b- glucan from the cultured fruit body of *A. blazei*. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 820–828.

Oliveira, R. J., Matuo, R., Silva, A. F., Matiazi, H. J., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., 2007. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (K1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells, *Toxicol. In Vitro* 21, 41-52.

Slamenová, D., Lábaj, J., Krizková, L., Kogan, G., Sandula, J., Bresgen, N., Eckl, P., 2003. Protective effects of fungal β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Letters* 198, 153–160.

Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods in Molecular Biology* 291, 85-95.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 1999. Single cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutat. Res.* 441, 215-224.

Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat. Res.* 468, 213-225.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Food, nutrition and the prevention of cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC, 1997.

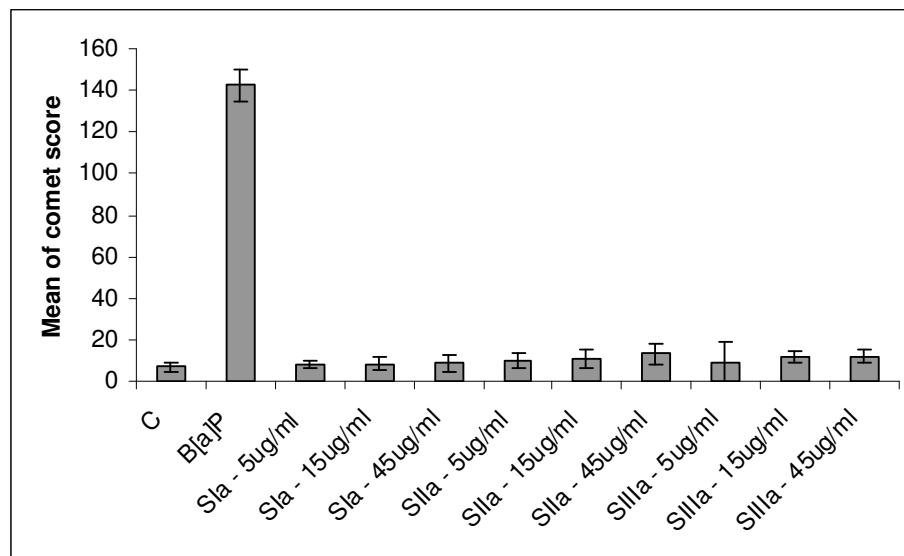


Figura 1: Efeito dos polissacarídeos totais extraídas do cogumelo *Agaricus brasiliensis* na migração de DNA na linhagem HepG2.. Barras representam a média dos escores \pm desvio padrão de três repetições independentes. (Controle DMSO – 1%; B[a]P – 5ug/ml; Sla – polissacarídeos extraídos fase imatura; SIIa – polissacarídeos extraídos na fase matura não esporulada; SIIIa – polissacarídeos extraídos na fase matura esporulada)

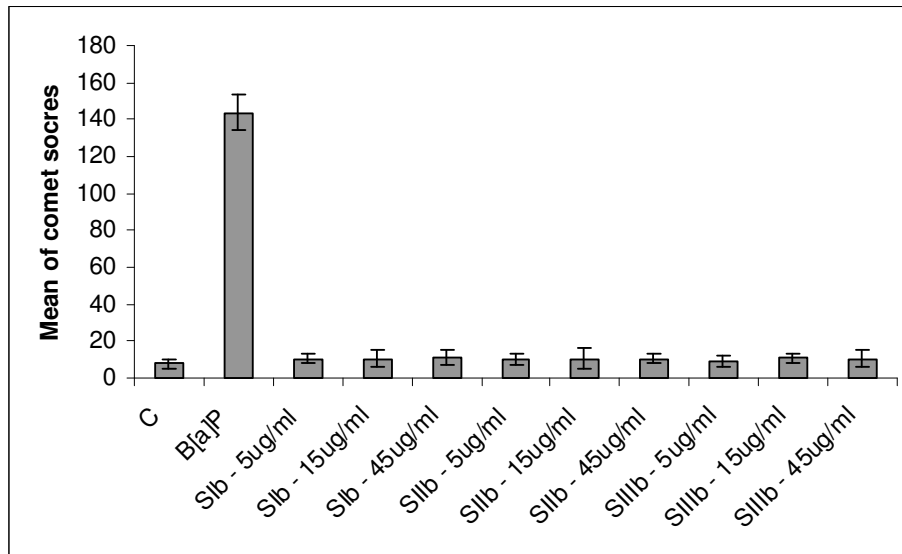


Figura 2: Efeito das β -glucanas extraídas do cogumelo *Agaricus brasiliensis* na migração de DNA na linhagem HepG2.. Barras representam a média dos escores \pm desvio padrão de três repetições independentes. (Controle DMSO – 1%; B[a]P – 5ug/ml; Slb – BG extraída na fase imatura; SIIb – BG extraída na fase madura não esporulada; SIIIb – BG extraída na fase madura esporulada).

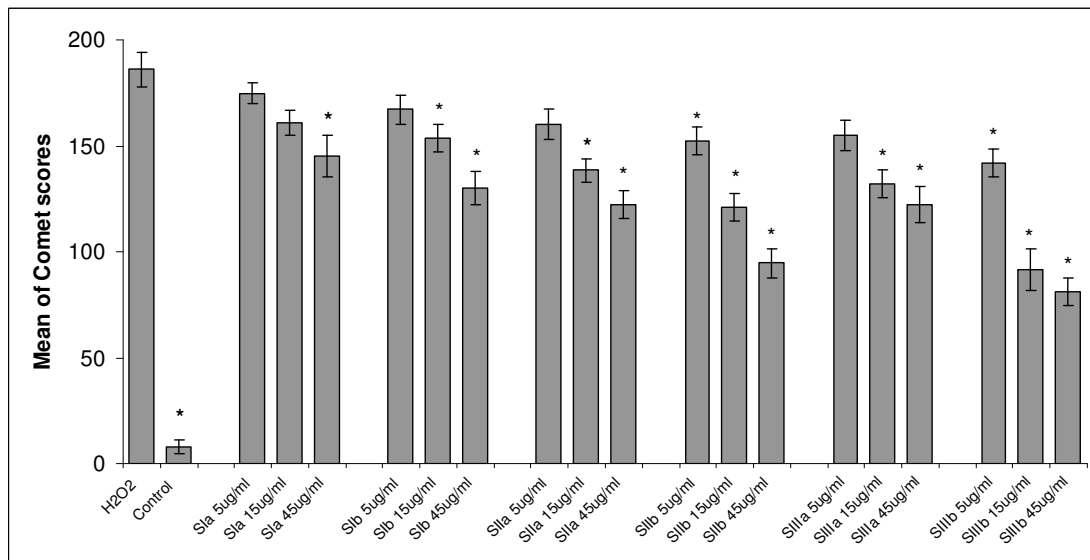


Figura 3: Efeito das frações do cogumelo *Agaricus brasiliensis* na migração de DNA induzido por H_2O_2 na linhagem HepG2.. Barras representam a média dos escores \pm desvio padrão de três repetições independentes. (Controle DMSO – 1%; H_2O_2 – 100 μ M; Sla – polissacarídeos extraídos fase imatura; SIIa – polissacarídeos extraídos na fase madura não esporulada; SIIIa – polissacarídeos extraídos na fase madura esporulada; Slb – BG extraída na fase imatura; SIIb – BG extraída na fase madura não esporulada; SIIIb – BG extraída na fase madura esporulada). (*) significativamente diferente do H_2O_2 ($p > 0,05$).

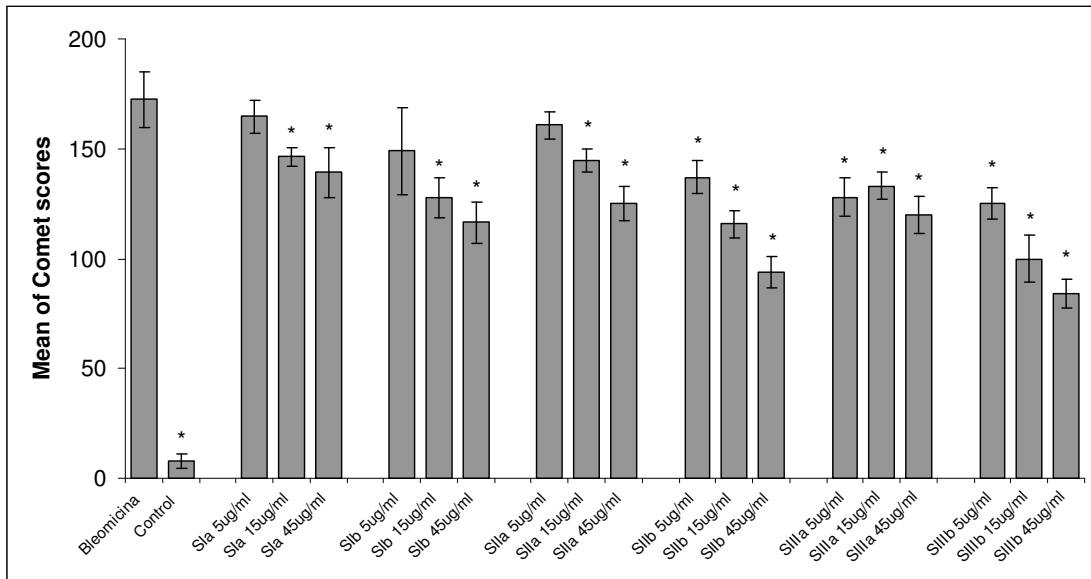


Figura 4: Efeito das frações do cogumelo *Agaricus brasiliensis* na migração de DNA induzido pela bleomicina na linhagem HepG2.. Barras representam a média dos escores \pm desvio padrão de três repetições independentes. (Controle DMSO – 1%; bleomicina – 0,5 μ g/ml; Sla – polissacarídeos extraídos fase imatura; SIIa – polissacarídeos extraídos na fase matura não esporulada; SIIa – polissacarídeos extraídos na fase matura esporulada; Slb – BG extraída na fase imatura; SIIIb – BG extraída na fase matura não esporulada; SIIIb – BG extraída na fase matura esporulada). (*) significativamente diferente da bleomicina ($p > 0,05$).

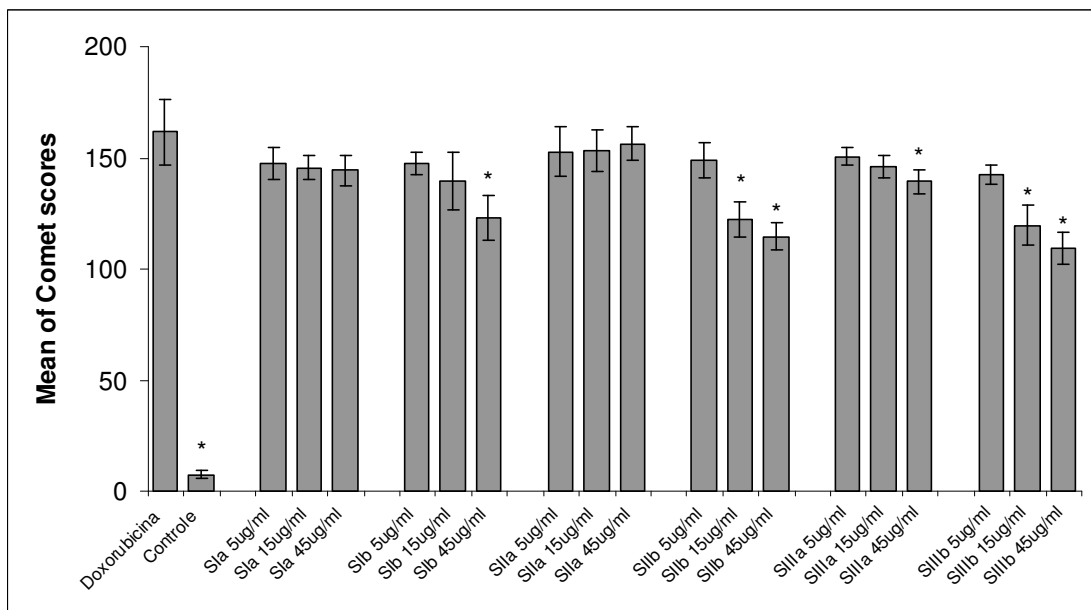


Figura 5: Efeito das frações do cogumelo *Agaricus brasiliensis* na migração de DNA induzido pela doxorubicina na linhagem HepG2.. Barras representam a média dos escores \pm desvio padrão de três repetições independentes. (Controle DMSO – 1%; doxorubicina – 1 μ g/ml; Sla – polissacarídeos extraídos fase imatura; SIIa – polissacarídeos extraídos na fase matura não esporulada; SIIa – polissacarídeos extraídos na fase matura esporulada; Slb – BG extraída na fase imatura; SIIIb – BG extraída na fase matura não esporulada; SIIIb – BG extraída na fase matura esporulada). (*) significativamente diferente da doxorubicina ($p > 0,05$).

Considerações finais

Os trabalhos realizados, utilizando a BG demonstraram em todos os casos eficiência na prevenção de dano genético, contra uma variedade de agentes químico, desde quimioterápicos até contaminantes alimentares.

Como demonstrado, a BG de cevada apresentou efeito protetor contra o B[a]P, 2AA, o MMS e o Ara-C em linhagens celulares de roedores e humanas, sendo importante ressaltar que a mesma foi a única a apresentar efeito genotóxico. A BG extraída de cogumelo apresentou efeito protetor contra B[a]P, Trp-p-2, bleomicina, doxorubicina e H₂O₂ em células humanas. Mostrando assim uma eficiência de proteção contra diversos tipos de agentes indutores de dano.

Acredita-se que as mesmas possam estar atuando se ligando aos diferentes compostos ou mesmo se ligando a radicais livres produzidos durante as suas ativações, porém não é descartada a hipótese de que modulem enzimas do metabolismo de xenobióticos e mecanismos de reparo ou apoptose.

Embora seja muito cedo para afirmar que a molécula de BG estaria atuando como um quimiopreventivo efetivo no ser humano, os resultados obtidos, encorajam futuros estudos de forma a comprovar se essa proteção estaria ocorrendo no homem, sugerindo assim a possibilidade de inclusão desse composto na dieta, na forma de cápsulas, ou mesmo na fortificação de alimentos como pães e cereais, com o intuito de disponibilizar alimentos mais saudáveis, e possivelmente protegendo a população de doenças desencadeadas por eventos mutacionais como é o caso do câncer. Uma outra possibilidade de introdução das BGs na dieta seria na produção de alimentos transgênicos.

Referências Bibliográficas

- AMES, B. N. Carcinogens and anticarcinogens, in: D.M. Shankel et al. (eds.) **Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms**. New York, Plenum, p. 7-35, 1986.
- AMES, B. N. **Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases**. *Science* V. 221 p. 1256-1264, 1983.
- BOEI, J. J. W. A., VERMEULEN, S. e NATARAJAN, A. T. **Detection of chromosomal aberrations by fluorescence *in situ* hybridization in the first three post irradiation division of human lymphocytes**. *Mutation Research*, n. 349, p. 127-135, 1996.
- BONASSI, S., ZNAOR, A, CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, Errol., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA., A., FABIANOVA, E. A., FUCIC, LANGMAR, H., JOKSIC, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M.R., ZIJNO, A., NORPPA, H., FENECH, M. **An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans**. *Carcinogenesis*, *in press*.
- BROCKMAN, H. E.; STACK, H. F.; WATERS, M. D. **Antimutagenicity profiles of some natural substances**. *Mutation Research* V. 267, p. 157-172, 1992.
- BRUSICK, D. J. **Principles of genetic toxicology**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1987, p. 284.
- CIMONS, M., **Cancer rates decline as cancer funding increases**, *Nature Medicine* V. 4, p.544. 1988

- DARROUDI, F. **Cytogenetic short term assays for genotoxicity post-graduate practical course 7-18 may.** Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Sylvius Laboratory, State University of Leiden, 1990.
- DE FLORA S., QUAGLIA, A., BENNICELLI, C. VERCELLI, M. **The epidemiological revolution of the 20th century.** *FASEBJ.* V.19, p.892–897. 2005.
- DE FLORA, S., IZZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., BALANSKY, R.M., NOONAN, D., ALBINI, A. **Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation related diseases.** *Mutation Research* V.480–481, p.9–22. 2001.
- DE FLORA, S., RAMEL, C. **Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview.** *Mutation Research* V.202, p.285–306. 1998.
- FENECH, M. & MORLEY, A. **Measurement of micronuclei in lymphocytes.** *Mutation Research*, n. 147, p. 29-36, 1985.
- FENECH, M., FERGUSON, L.R. **Vitamins/minerals and genomic stability in humans.** *Mutation Research* V.475, p.1-6. 2001.
- FERGUSON, L.R., **Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet.** *Mutation Research.* V.307, p.395–410. 1994.
- FERGUSON, L.R., PHILPOTT, M., KARUNASINGHE, N. **Dietary cancer and prevention using antimutagens.** *Toxicology* V. 198, p.147–159. 2004.
- GALLOWAY, S. M., MILLER, J. E., ARMSTRONG, M. J., BEAN, C. L., SKOPEK, T. R. e NICHOLS, W. W. DNA synthesis inhibition as a indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutation Research* V. 400, p. 169-186, 1998.
- GEBHART, E. **Antimutagens: Data and Problems.** *Humangenetik* V. 24, p. 1-32, 1974.

- GELDERBLOM, W.C., GALENDO, D., ABEL, S., SWANEVELDER, MARASAS, W.F., WILD, C.P. **Cancer initiation by fumonisin B(1) in rat liver—role of cell proliferation.** *Cancer Letters*, V.169, p. 127–137. 2001.
- HARTMAN, P. E. & SHANKEL, D. M. **Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, V. 15, p. 145-182, 1990.
- HEDDLE, J. A. (Coord.) **Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology.** New York: *Academic Press*, 1982.
- JAGERSTAD, M., SKOG, K. **Genotoxicity of heat-processed foods.** *Mutation Research* V.574, p. 156-172. 2005
- KADA, T., INOUE, T., NAMIKI, N. **Environmental desmutagens and antimutagens**, in: E.J. Klekowski (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, NJ, p. 137–151. 1982.
- KELLOFF, G.J. **Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development**, *Advances in Cancer Research*. V.78, p.199–334. 2000.
- KELLOFF, G.J., BOONE, C.W. (Eds.). **Cancer chemopreventive agents: drug development status and future prospects.** *Journal of Cell Biochemistry*. (Suppl. 20) 1–303. 1994.
- KELLOFF, G.J., HAWK, E.T., SIGMAN, C.C. (Eds.), **Cancer Chemoprevention: Promising Cancer Chemopreventive Agents**, vol. 1, Humana Press, Totowa, NJ, p.697. 2004.
- KIRSCH-VOLDERS, M. & FENECH, M. **Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes.** *Mutagenesis*, v. 16, n. 1, p. 51-58, 2001.

- KNASMÜLLER, S., MERSCH-SUNDERMANN, V., KEVEKORDES, S., DARROUDI, F., HUBER, W.W., HOELZL, C., BICHLER, J., MAJER, B.J. **Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge.** *Toxicology* V. 20, p. 315-328. 2004.
- KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; KADA, T. **Antimutagenicity in cultured mammalian cells.** *Mutation Research* V. 267, p. 201-209, 1992.
- LAST, J.M. **Scope and methods of prevention**, in: J.M. Last, J. Chin, J.E. Fielding, A.L. Frank, J.C. Lashoff, R.B. Wallace (Eds.), *Maxcy-Rosenau, Public Health and Preventive Medicine*, Appleton-Century-Crofts, Norwalk, CT, 1986, pp. 3-7.
- LAYTON, D.W., BOGEN, K.T., KNIZE, M.G., HATCH, F.T., JOHNSON, V.M., FELTON, J.S. 1995. **Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research.** *Carcinogenesis* V.16, p. 39-52. 1995.
- LEVI, F., LUCCHINI, F., NEGRI, E., LA VECCHIA C. **Cancer mortality in the European Union.** *International Journal of Cancer* V.98, p. 636-637. 2002.
- LOEB, L.A., LOEB, K.R., ANDERSON, J.P. 2003. **Multiple mutations and cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* V.100, p.776-781. 2003.
- LOHMAN, P.H.M., GENTILE, J.M., GENTILE, G., FERGUSON, L.R., **Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers.** *Mutation Research*, V. 496, p.1-4, 2001.
- MERSCH, J., BEAUVAIS, M. e NAGEL, P. **Induction of micronuclei in haemocytes and gill cell of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens.** *Mutation Research*, n. 371, p. 47-55, 1996.
- MORSE, M.A., STONER, G.D. **Cancer chemoprevention: principles and prospects.** *Carcinogenesis* V.14, p.1737-1746. 1993

- MOSESSO, P. **Comments on short-term cytogenetic assay for screening of environmental chemical carcinogens.** In: OBE, G.; NATARAJAN, A. T. (Ed.) **Chromosomal alterations: origin and significance.** New York: *Springer-Verlag*, 1994, p. 343-347.
- ODIN, A. P. **Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action.** *Mutation Research V.* 386, p. 39-67. 1997.
- ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. **Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communication.* **123**, 291–298. 1984
- PALOZZA, P., SERINI, S., TROMBINO, S., LAURIOLA, L., RANELLETTI, F.O., CALVIELLO, G. **Dual role of beta-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO₂.** *Carcinogenesis*, **27**; 2383-91. 2006.
- PRESTON, R. J. **Pathology of environmental and occupational disease.** St Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1995.
- RABELLO-GAY, M.N; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ *Revista Brasileira de Genética*, p. 107-112, 1991.
- RAMEL,C., ALEKPEROV, U.K., AMES, B.N., KADA, T., WATTENBERG, L.W. **Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis.** *Mutation Research V.*168, p. 47–65. 1986
- RODRIGUES, M. A. LA R. Teste CHO/HGPRT. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed) **Mutagênese,**

- Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação.** Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1991, p 67-74.
- SINGH, N. P., McCOY, M. T., TICE, R. R. e SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** *Experimental Cell Research*, n. 175, 184-191, 1988.
- SPORN, M.B., NEWTON, D.L. **Chemoprevention of cancer with retinoids,** *Federal Proceedings* V.38, p.2528–2534. 1979.
- SURH, Y.J. **Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals.** *Nature Reviews in Cancer* V.3, p.768–780. 2003.
- SWIERENGA, S. H. H.; HEDDLE, J. A.; SIGAL, E. A.; GILMAN, J. P. W.; BRILLINGER, O. L. DOUGLAS, G. R.; NESTMANN, E. R. **Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and lymphocyte cultures.** *Mutation Research*, n. 246, p. 301–322, 1991.
- TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. **Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment.** *Mutation Res.*, n. 365, p. 147-159, 1996.
- TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. **Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment.** *Mutation Research* V. 365, p. 147-159, 1996.
- WATTENBERG, L.W. **Inhibitors of chemical carcinogens,** in: J.H. Burchenal, H.F. Oettgen (Eds.), *Cancer: Achievements, Challenges and Prospects for the 1980s,* Grune and Stratton, New York, NY, 1981, pp. 517–540.

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