

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

MECANISMOS DE ANTIMUTAGENICIDADE DO COGUMELO
Agaricus brasiliensis SOBRE LESÕES NO DNA INDUZIDAS *IN*
VIVO E IN VITRO

MARINA MARIKO SUGUI

ORIENTADORA: DRA. LÚCIA REGINA RIBEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Patologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista - UNESP para obtenção do
título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Sugui, Marina Mariko.

Mecanismos de antimutagenicidade do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre lesões no DNA induzidas *in vivo* e *in vitro* / Marina Mariko Sugui. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2006

Orientador: Lúcia Regina Ribeiro

Assunto CAPES: 10601058

1. Cogumelo 2. Plantas medicinais

CDD 581.634

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*; Antimutagenicidade; CHO-k1 e HepG2; Múltiplos órgãos; Ratos Wistar.

Aos meus pais e irmãos, agradeço pelo carinho, pela compreensão, pelo incentivo e pelo sacrifício em todos os momentos.

A vocês, dedico mais esta conquista e meu amor!

*A Dra. Lúcia Regina Ribeiro, pelo apoio, amizade e principalmente
pela credibilidade com que me acolheu desde
o início de minha carreira científica.*

Muito obrigada!

A Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, por suas sugestões na elaboração do trabalho, pela sua amizade e seu profissionalismo sempre demonstrados. Obrigada!

Ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, pelos ensinamentos, suporte técnico, amizade e atenção em todos os momentos necessários. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira, pelo fornecimento das amostras do cogumelo, pelos esclarecimentos e paciência, pela amizade e carinho sempre demonstrados.

À amiga Patrícia Lepage Alves de Lima, pelos ensinamentos, apoio, dedicação, companheirismo desde a nossa graduação e acima de tudo pela amizade que nos une sempre.

Aos meus amigos do TOXICAN: Ana Lúcia, Ana Paula, Angela, Aniele, Bruno, Carla, Cristina, Daniel, Elaine, Glenda, Glória, Isa, João Paulo, Kátia, Liane, Luís Fernando, Mara, Marcelo, Mariana, Noeme, Paulo, Paulo César (PC), Priscilla, Renata e Rueda, pelo apoio, companheirismo e amizade. A todos vocês, o meu muito obrigado!

Aos meus inesquecíveis amigos e companheiros: Clarissa, Merielen, Rodrigo, Tony e Tânia, pelos momentos agradáveis e descontraídos que passamos juntos nos últimos anos de doutorado, que dure para sempre nossa amizade!

As minhas inesquecíveis amigas e companheiras: Cristiane, Fátima, Marcinha, Márcia, Renata e Vanessa, pela convivência, pelo incentivo e principalmente pela grande amizade que nos unem a cada dia de nossas vidas.

A Deus, o responsável maior por mais esta etapa concluída em minha vida!

Enfim, agradeço muito a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- └ *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(Proc. Nº.02/06526-0);*
- └ *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -
CNPq;*
- └ *Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – TOXICAN*
- └ *Curso de Pós-Graduação em Patologia – Faculdade de Medicina –
UNESP – Botucatu;*
- └ *Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina – UNESP –
Botucatu.*

I. Revisão da Literatura	
I.1 Considerações iniciais	01
I.2 Mutação e Câncer	03
I.3 Quimioprevenção	04
I.4 Antimutagenicidade	05
I.5 Cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i> S. Wasser et al.	07
I.6 Modelos para avaliação de danos no DNA	10
I.6.1 Teste do micronúcleo	10
I.6.2 Teste do cometa	11
I.6.3 Teste dos focos de criptas aberrantes	12
I.7 Estudos <i>in vitro</i>	13
I.7.1 Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO)	14
I.7.2 Células de Hepatoma Humano (HepG2)	15
I.8 Agentes Químicos	16
I.8.1 N-etil-N-nitrosuréia (ENU)	16
I.8.2 N-metil-N-nitrosuréia (MNU)	17
I.8.3 N-dietilnitrosamina (DEN)	18
I.8.4 N,N'—dimetilhidrazina (DMH)	18
I.8.5 Metilmetanosulfonato (MMS)	19
II. Referências	21
III. Objetivos	42
IV. Manuscrito 1	
Manuscrito 2	
V. Conclusões Gerais	43

I- Revisão da Literatura

I.1 Considerações Iniciais

O evento mutacional tem se tornado, de maneira crescente, alvo de avaliação científica. A relevância desta observação foi sustentada quando a associação entre mutação e câncer se tornou evidente (Loeb e Loeb, 2000). Considerando o fato de que a formação de tumores é um processo complexo, que envolve várias etapas, muitas das quais de origem epigenéticas, não se sabe, até o momento, em que extensão os fatores ambientais exerceriam papel significativo no surgimento de mutações. Por outro lado, uma série de dados experimentais sobre mutagênese e carcinogênese química mostra que compostos mutagênicos são altamente importantes no desencadeamento do processo carcinogênico (De Flora e Ramel, 1988).

Doll e Peto (1981) e Doll (1992) demonstraram que a grande maioria dos tipos de câncer humano é causada por agentes químicos ligados ao hábito de fumar, ao estilo de vida e à dieta. Desde então, surgiram importantes avanços sobre os mecanismos pelos quais muitos desses carcinógenos químicos levam ao surgimento de células neoplásicas em seres humanos, possibilitando, assim, a criação de bases para prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer (De Flora, 1988; Rogers *et al.*, 1993; Tanaka, 1997).

Atualmente, o estudo e a identificação de compostos naturais presentes na dieta humana, os quais podem prevenir danos genéticos induzidos por mutágenos e/ou carcinógenos têm assumido grande importância (Heddle *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2000; Hanausek *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2005; Hoensch e Kirch, 2005). Dessa forma, a quimioprevenção do câncer é uma ferramenta importante para

melhorar a qualidade de vida de populações humana, considerando que estratégias para a prevenção do câncer, envolvendo a redução ou eliminação da exposição humana a alguns fatores de risco nem sempre são possíveis (Willet, 1995, 2002). Assim, compostos com atividade antimutagênica e/ou anticarcinogênica, presentes na natureza, que sejam de fácil obtenção, são de grande relevância para a saúde pública e uma alternativa para a redução das taxas de neoplasias (Suaeyun *et al.*, 1997).

Dados da literatura mostram, por exemplo, que dietas contendo quantidades substanciais de vegetais e frutas podem reduzir a incidência de câncer em uma porcentagem significativa (Steinmetz e Potter, 1996; Pool-Zobel *et al.*, 1997; Murillo e Mehta, 2001; Collins *et al.*, 2003; Liu, 2003). Neste contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias nutricionais, as quais protejam o homem contra danos ao DNA e, principalmente, contra o desenvolvimento de câncer (Niederberger *et al.*, 2000; Surh e Ferguson, 2003).

O crescente interesse científico, nos últimos anos, e a perspectiva de uma valorização do cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem.) como fonte natural de substâncias antitumorais e potencialmente antimutagênicas, vêm contribuindo para a afirmação definitiva de interesse pelo estudo dos efeitos protetores deste cogumelo contra diferentes agentes químicos, em sistemas-teste próximos ao organismo humano.

I.2 Mutação e Câncer

Freqüentemente, o DNA sofre agressões por substâncias exógenas e endógenas. No entanto, as células possuem sistemas enzimáticos capazes de reparar a grande maioria desses danos. Embora esses sistemas sejam eficientes, algumas lesões, ou mesmo erros espontâneos durante a replicação do DNA, não são reparados, podendo resultar em um evento mutagênico. Esse evento pode corresponder à etapa de iniciação do processo carcinogênico (Tucker e Preston, 1996; Ramel, 1984).

O processo carcinogênico pode ser dividido em pelo menos quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação (Pitot, 1989, 1993; Sugimura, 1992). A etapa de iniciação corresponde à interação de agentes (físicos, químicos ou biológicos) com o DNA da célula alvo, levando, após um ciclo de divisão celular, a um dano permanente e irreversível, que se caracteriza pela alteração do material genético (mutação) sem, no entanto, provocar alterações fenotípicas evidentes; esta situação pode permanecer em latência durante anos até a etapa seguinte: a promoção. A etapa de promoção envolve expansão clonal de células iniciadas, geralmente associada com alterações morfológicas e/ou mudanças fenotípicas, isto é, ocorre a expressão fenotípica da mutação induzida na iniciação. Na etapa de progressão, a neoplasia maligna é expressa fenotipicamente em nível histológico, caracterizando-se pela instabilidade do genoma. Esta etapa fornece o substrato biológico para a última etapa da carcinogênese, que é a manifestação clínica do câncer (Pitot, 1989, 1993; Pitot e Dragan, 1991).

Sabendo que o processo de carcinogênese se dá em várias etapas e conhecendo os eventos biológicos que ocorrem em cada uma delas, torna-se possível à interferência sobre tais eventos, a fim de prevenir, minimizar ou interromper o desenvolvimento neoplásico (Suaeyun *et al.*, 1997).

I.3 Quimioprevenção

Muitos estudos experimentais, além de dados epidemiológicos, atribuem a maioria dos casos de câncer a fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo fatores nutricionais (Ooi e Liu, 2000; Lippman e Hong, 2002; Shukla e Gupta, 2005). Dentre estes, a dieta seria um dos principais fatores para vários tipos de câncer. O oposto também é válido, já que vários estudos têm apresentado evidências consistentes de que muitas substâncias presentes nos alimentos e na natureza oferecem proteção contra alguns casos de câncer (Reddy, 1996; Verhoeven *et al.*, 1997; Verhagen *et al.*, 1997; DeMarini, 1998; Liu, 2004; Hoensch e Kirch, 2005).

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como prevenção, inibição ou reversão do processo carcinogênico, através do favorecimento do consumo de agentes protetores, que podem ser ou não constituintes naturais da dieta (Kelloff *et al.*, 2000; Kelloff e Steel, 2005; De Flora e Fergunson, 2005). Atualmente, uma série de pesquisas que buscam utilizar produtos naturais, associados a tratamentos tradicionais, que venham minimizar ou inibir a incidência de câncer, tem sido destacada (Mitscher *et al.*, 1996; Hanausek *et al.*, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado a ocorrência de constituintes naturais com potencial antimutagênico e/ou anticarcinogênico (Lohman *et al.*, 1991). A ação antimutagênica e anticarcinogênica do β -caroteno foi identificada tanto em estudos *in vivo* como *in vitro* (Moreno *et al.*, 1991, 1995; Salvadori *et al.*, 1992,1994). Flavonóides são conhecidos possuir atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante (Hoensch e Kirch, 2005).

Desse modo, estudos realizados na área de quimioprevenção tornam possível a identificação de novos agentes que inibem o processo de carcinogênese em qualquer de suas várias etapas.

I.4 Antimutagenicidade

A dieta é uma mistura complexa de agentes químicos, entre os quais vários compostos foram identificados como antimutagênicos efetivos em sistemas *in vivo* e *in vitro* (Potter e Steinmetz, 1996; Park e Surh, 2004). Atualmente, numerosos estudos demonstram o grande interesse na identificação e quantificação de compostos antimutagênicos naturais, presentes na dieta humana, com o objetivo de reduzir a taxa de mutações espontâneas ou induzidas e, subsequêntemente, reduzir a incidência de câncer (Bárta *et al.*, 2000; Lohman *et al.*, 2001; Surh e Fergunson, 2003; De Flora e Fergunson, 2005).

O termo antimutagênico tem sido usado para designar vários agentes inibidores de mutação, e incluem tanto os desmutagênicos quanto os bioantimutagênicos. De acordo com Kada *et al.* (1986), os agentes desmutagênicoss atuam diretamente sobre os mutágenos através de reações

químicas, enzimáticas e adsorção, por meio de substâncias de alto peso molecular, como fibras, inibindo a ativação metabólica e as reações químicas que geram mutágenos. Verhagen *et al.* (1997) acrescentaram que os desmutágenos atuam, em sua maioria, em nível extracelular.

Os agentes bioantimutagênicos, por sua vez, podem agir como promotores do sistema de reparo do DNA, impedindo a fixação do dano no DNA (Kada *et al.*, 1982). Waters *et al.* (1990) citam que os bioantimutágenos atuam principalmente no sistema intracelular, e podem agir aumentando a atividade de enzimas de detoxificação, reagindo com compostos eletrofílicos ou ainda capturando radicais livres.

Vários estudos têm demonstrado a existência de inúmeros mecanismos de antimutagenicidade, entre eles: a) a prevenção da formação de metabólitos mutagênicos; b) a interdição dos agentes mutagênicos pelas enzimas ou pelos componentes celulares dos tecidos; c) a neutralização das lesões pré-mutagênicas; e d) a modulação dos mecanismos que aumentam a inativação metabólica de compostos mutagênicos (Antunes, 1997).

A aplicação prática da utilização de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos é ainda dificultada pelo fato de muitos deles também possuírem efeitos colaterais, sob certas condições. Assim, um maior número de estudos que proporcionam um melhor entendimento, seja do ponto de vista fisiológico, ou molecular, dos mecanismos de ação desses inibidores, levará a uma melhor análise do risco/benefício, e seleção desses agentes para quimioprevenção do câncer e de outras doenças relacionadas a eventos mutagênicos.

Dentre os agentes que vêm sendo avaliados quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer, o cogumelo comestível *Agaricus brasiliensis* tem despertado especial atenção devido suas propriedades medicinais (Wasser *et al.*, 2002) e por possuir em sua composição química compostos com atividade antimutagênica e/ou antitumoral (Kawagishi *et al.*, 1989, 1990; Mizuno *et al.*, 1990a,b; Itoh *et al.*, 1994; Ebina e Fujimiya, 1998; Fujimiya *et al.*, 1998; Stamets, 2000; Mizuno, 2002; Eira *et al.*, 2005).

1.5 Cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al

Desde a Antigüidade, os cogumelos comestíveis eram conhecidos por seu elevado valor nutritivo e terapêutico. *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem.), popularmente conhecido como “Himematsutake”, é um dos mais recentes cogumelos comestíveis e medicinais estudado. Originário do Brasil, mais especificamente da Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo, o cogumelo *Agaricus brasiliensis* foi descoberto casualmente em Tapiraí, região de Piedade – SP, e levado ao Japão, na década de 70. Das várias frações já extraídas do *A. brasiliensis*, muitas substâncias de grande valor nutritivo foram determinadas, como: aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais (Figura 1).

Estudos sobre a composição de seu corpo de frutificação têm indicado a existência de alguns compostos com ações imunoestimuladoras, antimutagênicas e anticarcinogênicas (Kawagishi *et al.*, 1989, 1990; Itoh *et al.*, 1994; Osaki *et al.*, 1994; Mizuno *et al.*, 1995, 1999; Cho *et al.*, 1999; Fujimya *et al.*, 1999, 2000; Reshetnikov *et al.*, 2001; Tsuchida *et al.*, 2001; Mizuno, 2002, Ebina, 2005).

Mizuno *et al.* (1995) relataram a atividade antitumor caracterizada pela inibição do crescimento do sarcoma 180 em camundongos, devido às propriedades imunomoduladoras de complexos proteico-polissacarídicos. Em 1997, Ito *et al.* concluíram que a inibição do crescimento de tumores pelo complexo proteico-polissacarídico (ATOM – antitumor organic substance Mie), preparado a partir do *A. brasiliensis* (Iwade strain 101), promovia a ativação do sistema complemento (C3) e estimulação da atividade fagocítica. Além de ativar o sistema imunológico, foi ainda descrito que o *A. brasiliensis* contém uma proteoglicana solúvel (ATF – acid-treated fraction) que não só possui efeito antitumoral seletivo indireto, mediado por ativação de células *natural killer*, mas um efeito direto inibindo o crescimento de células tumorais, *in vitro*, pela indução de apoptose (Fujimiya *et al.* 1998).

Até o final do século passado, apenas um estudo, em bactéria (teste de Ames), sugeria o potencial antimutagênico do cogumelo *A. brasiliensis* (Osaki *et al.*, 1994). As frações que apresentaram atividades antimutagênicas no teste de Ames foram denominadas IIa, IIb, IIc e IId, sendo o ácido linoléico a substância responsável pela atividade antimutagênica da fração IIa, e o ácido 13-hidroxi-cis-9-trans-11octadecadienóico (13ZE-LOH) pela atividade antibactericida da fração IIb (Osaki *et al.*, 1994). As substâncias químicas responsáveis pelas atividades antimutagênicas das frações IIb, IIc e IId não foram identificadas.

As atividades mutagênicas e antimutagênicas de soluções aquosas preparadas a partir de uma mistura de linhagens do cogumelo *A. brasiliensis* foram avaliadas por Delmanto *et al.* (2001) em células de medula óssea de camundongos pré-tratados com as soluções e posteriormente com o agente

mutagênico ciclofosfamida (CP) e, por Menoli *et al.* (2001) em células de pulmão de hamster Chinês (V79), *in vitro*, contra a mutagenicidade do metilmetanosulfonato (MMS). Recentemente, estudos envolvendo a modulação de mutações induzidas quimicamente ao DNA, utilizando soluções aquosas ou extratos orgânicos de linhagens isoladas do *A. brasiliensis*, *in vitro*, foram publicados por Oliveira *et al.* (2002), Luiz *et al.*, (2003) e Bellini *et al.*, (2003, 2005).

Efeito anticarcinogênico *A. brasiliensis* foi observado por Barbisan *et al.* (2002, 2003) e Pinheiro *et al.* (2003) utilizando soluções aquosas do cogumelo ou cogumelo incorporado à dieta contra a carcinogênese induzida quimicamente no fígado de ratos Wistar.

COMPONENTES		
%		(mg/ka)
Água	Fósforo	939,0
7,5	Ferro	18,2
Proteínas	Cálcio	41,6
36,7	Vitamina B1	0,48
Gordura	Vitamina B2	2,84
3,4	Vitamina D (Ergosterol)	354,0
	Niacina	40,9
	β-glucano	30-60

Fonte: COPERCOM: Cooperativa dos Produtores de Cogumelos de Sorocaba (1999)

Figura 1- Composição média do cogumelo *Agaricus brasiliensis* desidratado.

I.6 Modelos para avaliação de danos no DNA

I.6.1 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) é amplamente utilizado para avaliação de anomalias cromossômicas induzidas por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (MacGregor *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1994). De acordo com Sarto *et al.* (1987), os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se atrasam na migração para os pólos da célula, durante a anáfase. Essas estruturas são tipicamente arredondadas e possuem cor e textura semelhante ao núcleo principal. O teste do micronúcleo pode ser empregado para a avaliação do potencial mutagênico de agentes físicos, químicos e biológicos em células de vários órgãos, *in vivo* (MacGregor *et al.*, 1987), além de poder ser utilizado em modelos *in vitro* (Fenech e Morley, 1985). Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongo (Schmid, 1976), mas é também realizado em ratos (George *et al.*, 1990). Da mesma maneira, pode ser realizado em outros órgãos-alvo, por exemplo, o fígado (Igarashi *et al.*, 1997; Ohsawa *et al.*, 2000).

Assim, a presença de MN pode ser uma indicação prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas que ocorreram em algum momento do ciclo de vida das células-mãe (Carrano e Natarajan, 1988; Heddle *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1994).

1.6.2 Teste do Cometa

O teste do cometa é uma metodologia bastante útil para estudos de detecção de danos no DNA, induzidos por uma variedade de agentes em uma variedade sistemas *in vivo* e *in vitro* (Hartmann e Speit, 1997; Miyamae, *et al.*, 1997; Collins, 2004; Hartmann *et al.*, 2004).

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de microeletroforese em condições neutras para detecção de danos em células individualizadas. Entretanto, o uso de condições neutras para a eletroforese era um fator limitante do ensaio, pois permitia apenas a detecção de quebras de fita dupla de DNA. Assim, Singh *et al.* (1988) propuseram que a eletroforese fosse conduzida em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$). Nesse pH, o aumento de migração do DNA está associado a quebras de fita simples e duplas, sítios alcali-lábeis e à expressão de sítios com reparo incompleto. Devido à maioria dos agentes genotóxicos induzir mais quebras de fitas simples e sítios alcali-lábeis do que quebras de fita dupla, a versão alcalina do ensaio oferece maior sensibilidade para detecção de agentes genotóxicos.

O teste do cometa apresenta vantagens como simplicidade e rapidez na condução, sensibilidade para detecção de baixos níveis de dano, análise em nível de célula individualizada, pequeno número de células para análise, podendo ser aplicado em qualquer célula eucariótica e não necessitando de células em proliferação. Dessa forma, o teste do cometa, por se tratar de uma técnica que pode ser utilizada em estudos de toxicogenética, reparo de DNA, monitoramento ocupacional e ambiental e epidemiologia humana, tem sido amplamente

empregado em estudos de mecanismos de mutagênese e carcinogênese (Tice, 1995; Collins *et al.*, 1997; Speit e Hartmann, 1999; Moller *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004).

1.6.3 Teste dos focos de criptas aberrantes

Entre os biomarcadores da carcinogênese do cólon, destacam-se os marcadores de proliferação celular e os marcadores morfológicos, como as alterações estruturais precoces da mucosa, denominadas criptas aberrantes. As criptas aberrantes foram primeiramente descritas por Bird (1987) no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos e, mais tarde, por Pretlow *et al.* (1991), no cólon de pacientes com adenocarcinomas. Acredita-se que as criptas aberrantes sejam a expressão morfológica das alterações da proliferação e diferenciação celular que ocorrem devido a alterações da zona proliferativa das criptas durante o processo de carcinogênese do cólon. As criptas aberrantes podem ser identificadas isoladas ou em focos na mucosa do cólon, sendo designados focos de criptas aberrantes (FCA) (Tudek *et al.*, 1989). Os FCAs são observados, com maior frequência, no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem (Di Gregório *et al.*, 1997; Silva, 1999; Bononi *et al.*, 2000).

As criptas aberrantes no cólon de roedores são lesões pré-neoplásicas, consideradas como biomarcadores em testes de média duração para avaliação do potencial cancerígeno de agentes químicos, bem como para a identificação de quimioprotetores para o câncer (Bird, 1995; Hambly *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Schmelz *et al.*, 2000; Bazo *et al.*, 2002; Agner *et al.*, 2005). O número de focos de

criptas aberrantes (FCA) reflete, fenotipicamente, o número de lesões iniciais do processo cancerígeno da mucosa colônica, uma vez que existe uma relação entre a exposição ao cancerígeno e o número de FCA (McLellan *et al.*, 1991a,b). Por outro lado, é sugerido que os focos com maior número de criptas aberrantes possuem maior risco de se transformar em neoplasia de cólon, pois refletem o processo de proliferação das lesões iniciais (Shirtliff e Bird, 1996). Desta maneira, o número de criptas por foco é um parâmetro que pode indicar, com certa precisão, o risco para o desenvolvimento tumoral (Corpet *et al.*, 1990; Pretlow *et al.*, 1992; Bird e Good, 2000).

I.7 Estudos *in vitro*

Atualmente, uma grande expansão no uso de sistemas *in vitro* para estudar metabolismo de drogas tem sido documentado. Devido à simplicidade dos ensaios *in vitro*, estes são muito úteis no estudo de fatores que influenciam a farmacocinética e metalização de drogas (Lin, 1998). Os ensaios *in vitro*, que utilizam células de mamífero, têm a vantagem de possuir maior similaridade com o sistema humano e, conseqüentemente, com mutações importantes na etiologia de doenças degenerativas como o câncer e outras doenças genéticas.

Nos ensaios *in vitro*, utilizando cultura de linfócitos humanos ou linhagens celulares, como as de ovário de hamster Chinês (CHO), existe o problema da metabolização de drogas, uma vez que as células em cultura perdem a capacidade de metabolização dos compostos químicos. Assim, muitos laboratórios usam a fração S9 (fração microssomal de fígado de ratos tratados

com Aroclor 1254) para refletir o processo de ativação metabólica que ocorre *in vivo* (Wiebel *et al.*, 1980; Galloway *et al.*, 1994). Recentemente, Knasmüller *et al.* (2004) publicaram uma revisão com uma linhagem celular humana, conhecida como células de hepatoma humano (HepG2). Essa linhagem celular possui a capacidade de manter a maioria das funções dos hepatócitos humano, mimetiza o processo de toxificação/detoxificação que ocorre *in vivo* e reflete o metabolismo de genotóxicos melhor que os testes de mutação gênica em bactérias e células metabolicamente incompetentes (CHO, V79) (Natarajan e Darroudi, 1991; Rueff *et al.*, 1996; Knasmüller *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos *in vitro* são de fundamental importância para os experimentos *in vivo*, uma vez que fornecem dados sobre o grau de toxicidade, indica se a droga lesa o DNA (direta ou indiretamente), se as células são capazes de absorver a droga e se esta consegue atingir o DNA, além de revelar as concentrações ideais para experimentação (Kirkland e Muller, 2000).

1.7.1 Células de ovário de hamster Chinês (CHO)

A linhagem de células CHO-k1 foi derivada de um subclone de uma linhagem iniciada de células CHO de uma biópsia de ovário de hamster Chinês adulto, por Puck *et al.* (1958). Essas células possuem morfologia epitelial e crescem aderidas no meio de cultivo (Kao e Puck, 1968). As células CHO-k1 são consideradas metabolicamente incompetentes por serem desprovidas de enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos (Galloway *et al.*, 1994).

Segundo Knasmüller *et al.* (2002), aproximadamente 25.000 artigos em antimutagênese e anticarcinogênese têm sido publicados nos últimos 20 anos, sendo que a maioria dos estudos utiliza ensaios de mutagenicidade *in vitro* convencional, ou seja, com bactéria ou linhagens celulares estabelecidas (CHO, V79). Schwab *et al.* (2000) observaram que num total de 301 estudos publicados, 279 foram em testes de mutagenicidade *in vitro*. Assim, os testes *in vitro* com linhagens celulares que requerem adição de uma mistura exógena de enzimas (S9), ainda são os métodos mais utilizados em estudos de antimutagenicidade.

1.7.2 Células de hepatoma humano (HepG2)

As células HepG2 foram isoladas em 1979 de um hepatoblastoma de um garoto argentino de 11 anos de idade (Aden *et al.*, 1979). Possuem morfologia epitelial, semelhante às células do parênquima do fígado. As células HepG2 sintetizam e secretam muitas das principais proteínas plasmáticas de células normais de fígado humano (Knowles *et al.*, 1980). Essas células conservam as atividades de várias enzimas de fase I e II, as quais representam um importante papel na ativação e detoxificação de xenobióticos, além de refletirem o metabolismo de tais compostos, *in vivo*, melhor que outros modelos experimentais, com células metabolicamente incompetentes ou misturas exógenas (S9) (Knasmüller *et al.*, 1998).

Dessa forma, as células HepG2 têm sido utilizadas, com sucesso, em muitos estudos de mutagenicidade/antimutagenicidade de constituintes da dieta (Knasmüller *et al.*, 1998, Laky *et al.*, 2002; Kassie *et al.*, 2003; Mersch-

Sundermann *et al.*, 2004; Majer *et al.*, 2005) e são úteis na detecção de mecanismos de proteção, os quais não podem ser identificados em outros modelos *in vitro* (ex. células metabolicamente incompetentes) (Knasmüller *et al.*, 2002; Uhl *et al.*, 2003). O mesmo é válido para o ensaio de genotoxicidade/antigenotoxicidade com células HepG2, o qual torna-se um método promissor para a detecção de agentes que inibem a indução de danos primários ao DNA.

I.8 Agentes Químicos

I.8.1 N-etil-N-nitrosuréia (ENU)

O ENU (CAS No. 759-79-9) é um agente alquilante direto que promove a etilação de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* (Swann e Magee, 1971; Goth e Rajewsky, 1974 a,b; Lawley, 1974; Singer, 1975; Pegg, 1977). Este composto tem fórmula molecular $C_3H_7N_3O_2$ e peso molecular 117.1.

O efeito mutagênico do ENU foi demonstrado em *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Drosophila melanogaster*, plantas superiores e inferiores dentre outros organismos (Montesano e Bartsch, 1976; Neale, 1976). Além disso, efeitos do ENU sobre cromossomos humanos e de camundongos foram detectados em cultura de linfócitos e em medula óssea (Hitotsumachi *et al.*, 1992). O ENU, também, se mostrou positivo para o teste do cometa em fígado, pulmão, baço, rins e medula óssea de camundongos (Sasaki *et al.*, 1997).

O ENU foi estudado em muitas espécies animais (camundongos, ratos, hamster, coelhos, porcos e macacos) e em todas elas se mostrou mutagênico e carcinogênico (IARC, 1978), produzindo tumores benignos e malignos, dependendo da via de administração.

1.8.2 N-metil-N-nitrosuréia (MNU)

O MNU (CAS No. 684-93-5), um agente alquilante direto, pois não requer ativação metabólica, é um importante composto nitroso carcinogênico (IARC, 1978). É solúvel em água e solventes orgânicos polares, e insolúvel em solventes orgânicos apolares, sendo altamente reativo e sensível à umidade e à luz. A sua decomposição gradual ocorre ao armazenamento prolongado, em temperatura ambiente, emitindo substância tóxica como óxidos de nitrogênio (HSDB, 2001).

Atualmente, o MNU tem sido utilizado como agente quimioterápico em tratamento de câncer, sozinho ou em combinação com a ciclofosfamida. Efeitos mutagênicos em plantas foram estudados a uma dose baixa (IARC, 1972, 1978; HSDB, 2001) e seu efeito carcinogênico foi testado em todas as espécies animais (camundongos, ratos, hamsters Chinês e Europeu, porcos, coelhos, gerbils, cachorros e macacos), induzindo tumores benignos e malignos por diferentes vias de administração. Em relação à exposição ao MNU e surgimento de câncer no homem, não há existência de relatos comprovados, mas, devido às evidências de carcinogenicidade em animais de experimentação, é aceito dizer que o MNU é potencialmente carcinogênico para o homem (IARC 1972, 1978, 1987).

1.8.3 N-dietilnitrosamina (DEN)

A DEN (CAS No. 55-18-5) é uma substância volátil, sensível à luz, usualmente utilizada em experimentos de carcinogênese química. Esta nitrosamina é cancerígena em ratos, camundongos, hamsters, suínos e macacos, dentre outras espécies. A espécie animal e a via de administração influenciam os órgãos-alvo acometidos por lesões pré-neoplásicas e neoplásicas induzidas pela DEN, sendo o fígado e pulmão, aqueles com maior predileção (IARC, 1978).

A DEN requer ativação metabólica para exercer atividade citotóxica, genotóxica e cancerígena. O mecanismo de ação cancerígena da DEN envolve a formação de metabólitos reativos, após sua biotransformação pelas isoenzimas do sistema microssomal P450, sendo este sistema, também, responsável pela inativação destes metabólitos. A presença dos metabólitos reativos acarreta a formação de adutos, que são potencialmente mutagênicos (Swenberg *et al.*, 1991; Verna *et al.*, 1996).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, 1978, 1987) concluiu que a DEN é um agente carcinogênico para todas as espécies animais, e que há evidências suficientes para classificá-la como um provável cancerígeno para o homem, apesar da falta de dados epidemiológicos.

1.8.4 N,N'-dimetilhidrazina (DMH)

A DMH (CAS No. 57-14-7) é classificada como pró-cancerígeno, uma vez que necessita de ativação metabólica para se transformar em cancerígeno ativo.

Estudos *in vivo* mostraram que esta substância é metabolizada a azometano, azoximetano, metilazoximetanol, metildiazônio e carbônio (LaMont e O' Gorman, 1978), que podem reagir com o DNA causando lesões genotóxicas (Bertam, 1996; Whitekey *et al.*, 1996).

A administração da DMH a roedores produz reação inflamatória discreta e aumento da proliferação celular na mucosa do cólon (Krutovskikh e Turusov, 1994). Aplicações sucessivas resultam na expansão contínua do compartimento proliferativo, levando ao aumento do número de células em fase de síntese de DNA (Deschner, 1974; Wargovich *et al.*, 1996) e, conseqüentemente, à hiperplasia progressiva das criptas e hipertrofia da mucosa (Richards, 1977).

Modelos experimentais utilizando a DMH têm permitido o estudo e a evolução do câncer de cólon, desde a sua fase inicial até o desenvolvimento de tumores. Além disso, esses modelos têm contribuído para a identificação de agentes moduladores do processo cancerígeno (Pool-Zobel *et al.*, 1996; Hambly *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Bazo *et al.*, 2002; Agner *et al.*, 2005). Desta forma, a avaliação do efeito do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre os danos induzidos pela DMH pode fornecer informações importantes sobre seu potencial antimutagênico e anticancerígeno.

1.8.5 Metilmetanosulfonato (MMS)

O MMS (CAS No. 66-27-3) é um agente alquilante monofuncional, o qual atua diretamente em átomos de oxigênio e nitrogênio das bases do DNA, onde um extenso espectro de lesões no DNA é formado. Estas lesões são geralmente,

bases alquiladas, fosfotriesters e sítios abásicos, os quais podem levar a quebras de fita simples no DNA (Mirzayans *et al.*, 1988).

O MMS induz aumento na frequência de danos ao DNA, mutação gênica, troca de cromátides irmãs e micronúcleo em cultura de células humana e de roedores, bem como de aberração cromossômica em células de roedores *in vitro*. Há evidências suficientes do potencial carcinogênico do MMS, além de ser considerado uma substância potencialmente mutagênica em sistema teste *in vivo* e *in vitro* (IARC, 1999).

*II- Referências **

Aden DP, Vogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma derived cell line. *Nature* 1979;282:615-6.

Agner AR, Bazo AP, Ribeiro LR, Salvadori DMF. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutat Res.* 2005;582:146-54.

Antunes LMG. Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro* [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.

Barbisan LF, Miyamoto M, Scolastici C, Salvadori DMF, Ribeiro LR, Eira AF, Camargo JLV. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol.* 2002;83:25-32.

Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, Salvadori DMF, Ribeiro LR, Eira AF, Camargo JLV. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Gen Mol Res.* 2003;2:295-308.

Bárta I, Smerák P, Bártová J, Stetinar R. Antimutagenic effect of natural compounds. In: VIII. Congresso Annuale; 2000; Palermo: Societa Italiana di Mutagenesi Ambientale.

***International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01].**

Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniforme_requirements.html

National library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

Bazo AP, Rodrigues MAM, Sforcin JM, Camargo JLV, Ribeiro LR, Salvadori DMF. Protctive action of própolis on the rat colon carcinogenesis. Teratog Carcinog Mutagen. 2002;22:183-94.

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.

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 assay in CHO-k1 and HTC cells. Toxicol in Vitro. In press 2005.

Bertam TA. Aberrante crypt foci: new insights into the early events of colon carcinogenesis induced by gentoxic and nongenotoxic carcinogens. Toxicol Pathol. 1996;24:782-3.

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. Cancer Lett. 1987;37:147-51.

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanging the pathogenesis of colon cancer. Cancer Lett. 1995;93:55-71.

Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Toxicol Lett. 2000;112-113:395-402.

Bononi AP, Caetano CS, Rocha NS, Oliveira SV, Salvadori DMF, Camargo JLV. Lesões da bexiga e do cólon de ratos Wistar submetidos a carcinogênese química de duas etapas. Res Bras Cancerologia. 2000; 45:13-24.

Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Kyle JAM, Collins AR. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an iron meal. *Eur J Nutr.* 2000;39:213-23.

Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mut Res.* 1988;204:379-406.

Cho SM, Park J., Kim KP, Cha DY, Kim HM, Yoo ID. Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*. *Korean J Mycol.* 1999;27:170-4.

Collins A, Dusinká M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie SF, et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validations and application. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30:139-46.

Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis.* 2003;24:511-5.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnol.* 2004;26:249-61.

Corpet DE, Stamp D, Medline A, Minkin S, Archer MC, Bruce WR. Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar and cooked casein and fat. *Cancer Res.* 1990;50:6955-8.

De Flora S. Role and mechanisms of inhibitors in prevention of mutation and cancer. *Mutat Res.* 1988;202:277-449.

De Flora S, Izzotti A, Randerath K, Randerath E, Bartsch H, Nair, J, et al. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat Res.* 1996;366:197-238.

De Flora S, Fergunson LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2005;591:8-15.

Delmanto RD, Alves de Lima PL, Sugui MM, Da Eira AF, Salvadori DMF, Speit G, et al. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res.* 2001;496(1-2):15-21.

Demarini DM. Dietary interventions of human carcinogenesis. *Mutat Res.* 1998;400: 457-65.

Deschner EE. Experimentally induced cancer of the colon. *Cancer* 1974;34:824-8.

Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* 1997;30:328-34.

Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Natl Cancer Inst.* 1981;66:1191-3.

Doll R. The lessons of life: keynote address of the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.* 1992;52:2024-9.

Ebina T. Antitumor effects of intratumoral injection of basidiomycetes preparations. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2005;32:1654-6.

Ebina T, Fujimiya Y. Atitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Bitotherapy.* 1998;114:265.

Eira AF, Kaneno R, Filho ER, Barbisan LF, Pascholati SF, Piero RMD, et al. Farming technology, biochemistry characterization and protective effects of culinary-medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* S. Wassar et al. and *Lentinus*

edodes (Berk.) Singer: Five years of research in Brazil. Int J Med Mushr. 2005;7:281-99.

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res. 1985;147:29-36.

Ferguson LR, Bronzetti G, De Flora S. Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer. Mutat Res. 2005;591:3-7.

Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman KI, Kobori H, Nakashima H, Matumoto Y, et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. Cancer Immunol Immunother. 1998;46:147-59.

Fujimiya Y, Suzuki Y, Katakura R, Ebina T. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill. Anticancer Res. 1999;19:113-8.

Fujimiya Y, Yamamoto H, Noji M, Suzuki I. Peroral effect on tumor progression of soluble β -(1,6)-glucans prepared by acid treatment from *Agaricus blazei* Murr. (Agaricaceae, Higher Basidiomycetes). Int J Med Mushrooms. 2000;2:43-9.

Galloway SM, Aardema MJ, Ishidate MJr, Ivett JL, Kirkland DJ, Morita T, et al. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. Mutat Res. 1994;312:241-61.

George E, Wootton AK, Gatehouse DG. Micronucleus induction by azobenzene and 1,2-dibromo-3-chloropropane in rat: Evaluation of a triple-dose protocol. Mutat Res. 1990;324:129-34.

Goth R, Rajewsky MF. Persistence of O-6-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1974a;71:639-43.

Goth R, Rajewsky MF. Molecular and cellular mechanisms associated with pulse-carcinogenesis in the rat nervous system by ethylnitrosourea: ethylation of nucleic acids and elimination rates of ethylated bases from the DNA of different tissues. *Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*. 1974b;82:37-64.

Hambly RJ, Rumney CJ, Cunningham M, Fletcher JMF, Rijken PJ, Rowland IR. Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis* 1997;18:1535-9.

Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. Detoxifying cancer causing agents to prevent cancer. *Integr Cancer Ther*. 2003;2:139-44.

Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA- effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett*. 1997;90:83-8.

Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*. 2004;19:51-9.

Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders SM, et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res*. 1994;312:293-304.

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen*. 1991;18:277-91.

Heddle JA, Moody J, Thompson LU, Toorus DK, Trentin G. New approaches to antimutagenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1999;18:95-101.

Hitotsumachi S, Kimura Y, Katoh M, Ishihara N, Hara T, Shibuya T. Micronucleus test on N-ethyl-N-nitrosourea with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1992;278: 113-5.

Hoensch HP, Kirch W. Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. *Int J Gastrointest Cancer.* 2005;35:187-95.

Hazardous substances data base. National Library of Medicine (HSDB). Washington; 2001.

Igarashi M, Shimada H. An improved method for the mouse liver micronucleus test. *Mutat Res.* 1997;391:49-55.

International Agency for Research on Cancer. Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, N-nitroso compounds and natural products. Lyon: IARC; 1972. p.184. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, v. 1.

International Agency for Research on Cancer. Some N-Nitroso compounds: Lyon: IARC; 1978. p.365. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, v. 17.

International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity. Lyon: IARC; 1987. p.440. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, supplement 7.

International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity: Lyo: IARC; 1999. p.1059. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, v. 71.

Ito H, Shimura K, Itoh H, Kawade M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (IWADE Strain 101) "Himematsutabe" and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 1997;17:277-84.

Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. Inhibitory action of a (1(6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol.* 1994;466:265-71.

Kada T, Inoue T, Namiki N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski EJ, editor. *Environmental mutagenesis and plant biology*. New York : Praeger;1982. p.137-51.

Kada T, Inoue T, Morita K, Namiki M. Dietary desmutagens. *Progr Clin Biol Res.* 1986;20: 6245-53.

Kao FT, Puck TT . Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;60: 1275-81.

Kassie F, Laky B, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Lhoste E, et al. Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo[a]pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay. *Chemico-Biol Interact.* 2003;142:285-96.

Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res.* 1989;186: 267-73.

Kawagishi H, Kanao T, Inagaki R, Mizuno T, Shimura K, Ito H, et al. Formolysis of a potent antitumor (1-6) β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. Carbohydr Polymers. 1990;12:393-403.

Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA. Progress in cancer chemoprevention: Development of diet-derived chemopreventive agents. Symposium: Diet, natural products and cancer prevention: Progress and promise. J Nutr. 2000;130:467-71.

Kelloff G, Steel V. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. Mutat Res. 2005;591:16-23.

Kim JM, Araki S, Kim DJ, Park CB, Takasuka N, Baba-Toriyama H, et al. Chemoprevention effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2 dimethylhydrazine initiation. Carcinogenesis. 1998;19:81-5.

Kirkland DJ, Muller L. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. Mutat Res. 2000;464:137-47.

Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutat Res. 1998;402(1-2):185-202.

Knasmüller S, Steinkellner H, Majer BJ, Nobis EC, Scharf G, Kassie F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. Food Chem Toxicol. 2002;40:1051-62.

Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber WW, Hoelzl C. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental

and dietary genotoxics; current state of knowledge. *Toxicology*. 2004;198:315-28.

Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cells lines secrete the major plasma proteins and hepatitis b surface antigen. *Science*.1980;209:497-9.

Krutovskikh VA, Turusov VS. Tumours of the intestines. IARC Sci Publ.1994;111:195-221.

Laky B, Knasmüller S, Gminski R, Mersch-Sudermann V, Scharf G, Verkerk R, et al. Protective effects of Brussels sprouts towards B[a]P-induced DNA damage: a model study with the single-cell gel eletroforesis (SCGE)/HepG2 assay. *Food Chem Toxicol*. 2002;40:1077-83.

Lamont JT, O’Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology*. 1978;75:1157-69.

Lawley PD. Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis. *Mutat Res*. 1974;23:283-95.

Lippman SM, Hong WK. Cancer prevention science and practice. *Cancer Res*. 2002;62:5119-25.

Lin JH. Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. *Am Soc Pharmacol Exp Ther*. 1998;26:1202-11.

Liu RH. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:517S-20S.

Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. Am Soc Nutr Sci. 2004;22:3479S-85S.

Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. Carcinogenesis. 2000;21:379-85.

Lohman PHM, Gentile JM, Gentile G, Fergunson LR., editors. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. Mutat Res. 2001;496:1–230.

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.

MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutat Res. 1987;189:103-12.

Majer BJ, Hofer E, Cavin C, Lhoste E, Uhl M, Glatt HR, et al. 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 Chem Toxicol. 2005;43:433-41.

McLellan EA, Medline A, Bird RP. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions in rat colon. Carcinogenesis. 1991a;12:2093-8.

McLellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analysis of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. Cancer Res. 1991b;51:5270-4.

Menoli RCA, Montovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordão BQ. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutat Res.* 2001;496(1-2):5-13.

Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F. Use of a human derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology.* 2004;198:315-28.

Mirzayans R, Liuzzi M, Paterson MC. Methylmethanesulfonate-induced DNA damage and its repair in cultured human fibroblasts: normal rates of induction and removal of alkali-labile sites in xeroderma pigmentosum (group A) cells. *Carcinogenesis.* 1988;9:2257-63.

Mitscher LA, Telikepalli H, McGhee E, Shankel DM. Natural antimutagenic agents. *Mutat Res.* 1996;350:143-52.

Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki YF. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res.* 1997;393:99-106.

Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agric Biol Sci.* 1990a;54:2889-96.

Mizuno T, Inagaki R, Kanao T. Antitumor activity and some properties of water-soluble hetero-glycans from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agric Biol Sci.* 1990b;54:2897-905.

Mizuno T, Saito H, Nishitoba T, Kawagishi H. Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Rev Int.* 1995;11:23-61.

Mizuno T, Minato K, Ito H, Kawade M, Terai H, Tsuchida H. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. *Biochem Mol Biol Int.* 1999;47:707-14.

Mizuno T. Medicinal properties and clinical effects on *Agaricus blazei* Murrill. *Int J Med Mushrooms.* 2002;4:299-12.

Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1005-15.

Montesano R, Bartsch H. Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds; possible environmental hazards. *Mutat Res.* 1976;32:179-228.

Moreno FS, Rizzi MB, Dagl ML, Penteado MV. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis* 1991;12:1817-22.

Moreno FS, Wu TS, Penteado MV, Rizzi MB, Jordão Júnior AA, Almeida-Muradian LB, et al. A comparison of beta-carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int J Vitam. Nutr. Res.* 1995;65:87-94.

Murillo G, Mehta RG. Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr Cancer.* 2001;41(1-2):17-28.

Natarajan AT, Darroudi F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis.* 1991;6:399-403

Neale S. Mutagenicity of nitrosamides and nitrosamidines in microorganisms and plants. *Mutat Res.* 1976;32:229-66.

Niederberger E, Meiers S, Genzlinger A, Zankl H, Tang WC, Eisenbrand G, et al. Flavones and inhibition of tumor cell growth: new aspects on the mechanism of action. In: Eisenbrand G, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Schlatter J, editors. Carcinogenic and anticarcinogenic factors in food, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) –Symposium 2000, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, p. 512-3.

Ohsawa K, Suzuki H, Hirano N, Hirashio T, Kimura M. Variation in the frequency of micronucleated hepatocytes following time course treatment in the mouse: liver micronucleus assay of partially hepatectomized tissues. Biol Pharm Bull. 2000;23:1001-4

Ooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. Curr Med Chem. 2000;77:715-29.

Oliveira JM, Jordão BQ, Riberio LR, Eira AF, Mantovani MS. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. Food Chem Toxicol. 2002;40:1775-80.

Osaki Y, Kato T, Yamamoto K, Okubo J, Miyazaki T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. Yakugaku-Zasshi. 1994;114:342-50.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123:291-8.

Park OJ, Surh YJ. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. Toxicol Lett. 2004;150:43-56.

Pegg AE. Formation and metabolism of alkylated nucleosides: possible role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating agents. *Adv Cancer Res.* 1977;25:195-269.

Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira, AF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1543-50

Pitot HC. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 1989;80:599-607.

Pito HC , Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* 1991;5:2280-6.

Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 1993;72:962-70.

Pool-Zobel BL, Naudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rummey C, et al. Lactobacillus- and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats: Prevention of carcinogen-induced DNA-damage and elucidation of involved mechanisms. *Nutr Cancer.* 1996;26:365-80.

Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results a human intervention study with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis.* 1997;18:1847-50.

Potter JD, Steinmetz K. Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. In: Stewart BW, McGregor D, Kleihues P, editors. *Principles of chemoprevention.* Lyon: IARC Scientific Publications, 1996. n.139, p. 61-91.

Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'riordan MA, Pretlow TG, Incisek JA, et al. Aberrant cryts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991;5:1564-7.

Pretlow TP, O'riordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis*. 1992;13:1509-12.

Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*. 1958;108:945-56.

Ramel C. General environmental modifiers of carcinogenesis. *Acta Pharmacol. Toxicol*. 1984;5:181-96.

Reddy BS. Micronutrients as chemopreventive agents. In: Stewart BW, McGregor D, Kleihues P, editors. *Principle of chemoprevention*, IARC Scientific Publications, 1996. p. 221-35.

Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int J Med Mushrooms*. 2001;3:361-94.

Ribeiro LR, Takahashi CS, Erdtman B, Oliveira SV, Costa CTA. Inter-laboratory calibration program for the mouse micronucleus test. *Rev Bras Genet*. 1993;16:631-8.

Richards TC. Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res*. 1977;37:1680-5.

Rogers AE, Zeisel S, Groopman J. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1993;14:2205-17.

Rueff J, Chiapella C, Chipman JK, Darroudi F, Duarte Silva I, Duverger-van M, et al. Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat Res.* 1996;353:151-76.

Salvadori DMF, Ribeiro LR, Oliveira MDM, Pereira CAB, Beçak W. The protective effect of beta-carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res.* 1992; 265:237-44.

Salvadori DMF, Ribeiro LR, Natarajan AT. Effect of beta-carotene on clastogenic effects of mitomycin C, Methyl methanesulfonate and bleomycin in CHO cells. *Mutagenesis.* 1994;9:53-7.

Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987;2:11-17.

Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat Res.* 1997;388:33-44.

Schmelz EM, Sullards MC, Dillehay DL, Merrill AHJR. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. *J Nutr.* 2000;130:522-7.

Schmid W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Hollaender A, editor. *Principles and methods for their detection.* New York : Plenum Press; 1976. v.4, p.31-53.

Schwab CE, Huber WW, Parzefall W, Hietsch G, Kassie F, Schulte-Hermann R, et al. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Crit Rev Toxicol.* 2000;30:1-69.

Shirliff N, Bird RP. Growth features of aberrant crypt foci that resist modulation by cholic acid. *Carcinogenesis*. 1996;17:2093-6.

Shukla S, Gupta S. Dietary agents in the chemoprevention of prostate cancer. *Nutr Cancer*. 2005;53:18-32.

Silva LAG. Criptas aberrantes como biomarcador da oncogênese do cólon: análise comparativa entre testes de curta e média duração em modelo de carcinogênese pela DMH no rato. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1999.

Singer B. The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1975;15:219-84.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-91.

Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson DS, editor. *Methods in Molecular Biology*, v. 13, DNA repair protocols: Eukaryotic Systems. Totowa: Humana Press; 1999. p.203-12.

Stamets P. Techniques for the cultivation of the medicinal mushroom Royal Sun Agaricus – Agaricus blazei Murrill (agaricomycetidae). *Int J Med Mushroom*. 2000;2:151-60.

Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *Am Dietet Assoc*. 1996;96:1027-39.

Suaeyun R, Kinouchi T, Arimochi H, Vinitketkummuen U, Ohnishi Y. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus stapf*) on formation of azoxymethane

induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. Carcinogenesis.1997;8:949-55.

Sugimura T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. Science. 1992;258:603-7.

Surh YJ, Fergunson LR, editors. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potencial. Mutat Res. 2003;523-524:1-278.

Swann PF, Magee PN. Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitrosoourea and ethyl methanesulphonate. Biochem J. 1971;125:841-947.

Swenberg JA, HoelDG, Magee PN. Mechanitic and statistical insight ti the large carcinogenesis bioassay on N-nitrosodiethylamine and N-nitrossodimethylamine. Cancer Res.1991;51:6409-14.

Tanaka T. Effect of diet on human carcinogenesis. Crit Rev Oncol Hematol. 1997;25:73-95.

Tice RR. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth FM, editor. Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental change. New York: Plenum Press; 1995.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 2000;35:.206-21.

Tsuchida H, Mizuno M, Taniguchi Y, Ito H, Kawade M, Akasaka K. Glucomannan separated from *Agaricus blazei* mushroom culture and antitumor agent containing as active ingredient. Japanese Patent. 2001:11:080206.

Tucker, JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatide exchanger and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 1996;365:147-59.

Tudek B, Bird RP, Bruce WR. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.* 1989;49:1236-40.

Uhl M, Ecker S, Kassie F, Lhoste E, Chakraborty A, Mohn G, et al. Effect of chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and benzp(a)pyrene [B(a)P] in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. *Arch Toxicol.* 2003;77:477-84.

Verhagen H, Rompelberg CJM, Strube M, van Poppel G, van Bladeren PJ. Cancer prevention by dietary constituents in toxicological perspective. *Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1997;16:343-60.

Verhoeven DTH, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by *Brassica* vegetables. *Chem-Biol Interact.* 1997;103:79-129.

Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenit]city, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.* 1996;71:57-81.

Wargovich MJ, Chen C, Jimenez A, Steele VE, Velasco M, Stephens LC, et al. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluations of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent.* 1996;5:355-60.

Wasser SP, Didukh M, Amazonas MALL, Nevo E, Stamets P, Eira AF. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *Int J Med Mushrooms.* 2002;4:267-90.

Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brookman HE. Antimutagenic profiles for some model compounds. *Mutat Res.* 1990;238:57-85.

Whiteley LO, Hudson LJr, Pretlow TP. Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen. *Toxicol Pathol.* 1996;24:681-9.

Wiebel FG, Schwarz LR, Goto T. Mutagen metabolizing enzymes in mammalian cell cultures: possibilities and limitations for mutagenicity screening. In: Norpoth KH, Garner RC, editors. Berlin: Springer Verlag; 1980. p.209-18.

Willett WC. Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect.* 1995;103:165-70.

Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 2002;296:695-8.

III- Objetivos

Estudos com o cogumelo *Agaricus brasiliensis* apresentaram resultados sobre o seu potencial antimutagênico e antígenotóxico *in vivo* e *in vitro*. A avaliação do mecanismo da ação protetora do *A. brasiliensis* nos permitirá identificar o modo de ação responsável pelos efeitos biológicos deste cogumelo. Assim, o presente estudo teve os seguintes objetivos:

- ⌘ Avaliar o mecanismo de ação do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre danos induzidos no DNA em células de múltiplos órgãos de ratos Wistar;
- ⌘ Avaliar a ação de diferentes extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* em dois diferentes tipos de células, *in vitro*.

IV- Manuscrito 1

**Efeito protetor do cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. em
múltiplos órgãos de ratos Wistar [#]**

Marina M. Sugui,^{1*} Patrícia L. Alves de Lima,¹ Angela I.M. Petrócio,¹ Daisy M.F. Salvadori,² Lúcia R. Ribeiro.²

¹ TOXICAN – Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena, Depto. de Patologia, Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu – SP, Brasil.

² Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina – UNESP , Botucatu – SP, Brasil.

* Correspondência: Marina Mariko Sugui, Rua: José Nelson Nasrauí nº. 300, 17.511-490, Marília - SP, Brasil, Tel. 55-14-3425-2201, Fax: 55-14-3815-2348.

E-mail: masugui@hotmail.com

De acordo com as normas da Revista *Environmental and Molecular Mutagenesis*.

ABSTRACT

Antimutagenicity studies in literature have shown that substances isolated from the *Agaricus brasiliensis* mushroom S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem.) reduce mutation frequency in bacteria. Also *in vivo* and *in vitro* studies on aqueous solutions from this mushroom have shown reduced frequencies of induced mutations, however these action mechanisms are still unknown. The aim of this study was to evaluate the protector effect of an aqueous solution of *A. brasiliensis* (AB 99/29 lineage) in Wistar rat bone marrow, peripheral blood, bladder, colon, and liver. Different experimental protocols (micronucleus test, comet assay, and aberrant crypt foci test) were used for a more extensive evaluation of the chemopreventive effect of *A. brasiliensis*. Animals were treated with an aqueous solution (60°C) and target organ agents (ENU, MNU, DMH, and DEN). Results indicated that *A. brasiliensis* aqueous solution did not have any mutagenic, genotoxic, or carcinogenic effects under test conditions. However an antimutagenic effect against ENU mutagenicity was seen in bone marrow cells, and there was a significant reduction in the number of DMH induced aberrant crypts per focus (4-6 crypts/focus) in the colon of animals post-treated with aqueous mushroom solution. Our results suggest that aqueous solution of *A. brasiliensis* (AB 99/29) may contain components which significantly reduce the frequency of micronucleated cells in Wistar rat bone marrow, and that they could have an effect on a post-initiation stage of the carcinogenesis process.

Key words: mushroom, antimutagenicity, chemoprevention, micronucleus test, comet assay, aberrant crypt foci test .

RESUMO

Estudos de antimutagenicidade, relatados na literatura, mostram que substâncias isoladas do cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem.) reduzem a frequência de mutações em bactéria. Por outro lado, pesquisas com soluções aquosas desse cogumelo também indicam diminuição da frequência de mutações induzidas, tanto *in vivo* como *in vitro*, mas o(s) seu(s) mecanismo(s) de ação ainda são desconhecidos. Dessa forma, avaliamos o efeito protetor de uma solução aquosa do *A. brasiliensis* (linhagem AB 99/29) em medula óssea, sangue periférico, bexiga, cólon e fígado de ratos Wistar. Diferentes protocolos experimentais (teste do micronúcleo, teste do cometa e teste de focos de criptas aberrantes) foram utilizados para uma avaliação mais ampla do efeito quimiopreventivo do *A. brasiliensis*. Os animais foram tratados com a solução aquosa (60° C), e com os agentes órgãosalvo (ENU, MNU, DMH e DEN). Os resultados indicam que a solução aquosa do *A. brasiliensis*, sob as condições testadas, não revelou efeito mutagênico, genotóxico e carcinogênico. Entretanto, um efeito antimutagênico contra a mutagenicidade do ENU foi observado em células da medula óssea, bem como uma redução significativa no número de criptas aberrantes por foco (4-6 criptas/foco) induzidas pela DMH no cólon dos animais pós-tratados com a solução aquosa do cogumelo. Nesse contexto, nossos resultados sugerem que a solução aquosa do *A. brasiliensis* (AB 99/29) pode possuir compostos que reduzem significativamente a frequência de células micronucleadas da medula óssea de ratos Wistar, e que os mesmos podem atuar numa etapa posterior à iniciação do processo de carcinogênese.

Palavras chave: cogumelo, antimutagenicidade, quimioprevenção, teste do micronúcleo, teste do cometa e teste de focos de criptas aberrantes.

INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis são reconhecidos como uma boa fonte de compostos bioativos, os quais podem ser benéficos para a saúde humana (Mizuno, 2002; Wasser et al., 2002). Atualmente, o principal efeito estudado dos cogumelos é a sua atividade antitumoral (Borchers et al., 1999, Reshetnikov et al., 2001, Wasser et al., 2002). A maioria dos estudos relaciona a atividade antitumoral com a estimulação do sistema imune (Wasser e Weiss, 1999; Ebina, 2005). Entretanto, dados sobre efeitos biológicos dos cogumelos são escassos, especialmente com relação à atividade antimutagênica (Grüter et al., 1991, Osaki et al., 1994).

Agaricus brasiliensis S. Wasser et al. (= *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem.) é um cogumelo comestível originário do Brasil e, recentemente, tem recebido atenção especial devido às suas propriedades medicinais, incluindo os efeitos contra doenças de origem mutacional, como o câncer (Wasser et al., 2002). O efeito antimutagênico do *A. brasiliensis*, avaliado pelo teste de Ames, mostrou que várias frações isoladas do cogumelo inibiram a mutagenicidade do benzo[a]pireno, sendo o ácido linoléico o responsável por esse efeito em uma das frações isoladas (Osaki et al., 1994). Resultados experimentais envolvendo a modulação de mutações quimicamente induzidas ao DNA, utilizando soluções aquosas de uma mistura de linhagens do cogumelo *A. brasiliensis* foram publicados por Delmanto et al. (2001) e Menoli et al. (2001), em estudos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Sob as condições testadas, os autores acima citados relatam que o cogumelo *A. brasiliensis* pode ser considerado um efetivo agente

quimioprotetor, permanecendo seu modo e seu(s) mecanismo(s) de ação ainda desconhecidos.

De acordo com Sasaki et al. (1998), a avaliação do mecanismo de ação de compostos quimioprotetores em múltiplos órgãos, de um mesmo animal, pode gerar informações importantes, considerando que os metabólitos gerados pelos mesmos podem agir de modo diferente, em diferentes órgãos. Assim, a utilização de diferentes biomarcadores em estudos de quimioprevenção pode fornecer informações a respeito do mecanismo de ação desses compostos, bem como auxiliar na identificação da etapa da carcinogênese em que eles estão atuando.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito protetor de uma solução aquosa do cogumelo *A. brasiliensis* (linhagem AB 99/29), preparada a 60º C, em sangue periférico, medula óssea e múltiplos órgãos (bexiga, cólon e fígado) de ratos Wistar, mostrando a importância do estudo em diferentes órgãos quando se utilizam agentes quimioprotetores, além de identificar um possível modo de ação do cogumelo *A. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e ambiente de experimentação

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº. 277) da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu-SP, Brasil. Foram utilizados ratos Wistar machos, com 6 semanas de idade, pesando em média 200g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) - UNICAMP, Campinas-SP, Brasil, e mantidos no Biotério do

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina –UNESP, Botucatu-SP. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno (6-8 animais por gaiola), recebendo ração basal peletizada (Purina) e água filtrada *ad libitum*, e permanecerão durante todo o período experimental sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua.

Cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.

O cogumelo *A. brasiliensis* (linhagem AB 99/29) foi fornecido em pó seco pelo Departamento de Produção Vegetal – Módulo de Cogumelos - Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP - Botucatu, SP, Brasil. Uma solução aquosa (5 g/200 mL) foi preparada a 60°C , filtrada e armazenada em freezer até o momento do uso. A solução foi administrada aos animais, via oral (4 mL/dia/animal, por gavagem) ou como água de beber, durante o período experimental.

Agentes químicos

N-etil-N-nitrosuréia (ENU, CAS No. 759-79-9), N-metil-N-nitrosuréia (MNU, CAS No. 684-93-5), N,N-dimetilhidrazina (DMH, CAS No. 57-14-7) e N-dietilnitrosamina (DEN, CAS No. 55-18-5), foram obtidos da Sigma, St. Louis MO (USA). O ENU (50 mg/kg) foi dissolvido em tampão fosfato (pH 6,0); MNU (30 mg/kg) e DEN (20 ou 50 mg/kg) foram dissolvidos em NaCl 0,9% e DMH (40 mg/kg – 2 doses por semana/2 semanas) foi dissolvida em solução de EDTA a 37%, todos no momento do uso. Os agentes químicos foram administrados aos

animais por via intraperitoneal, exceto no caso da DMH, administrada por via subcutânea.

Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo em medula óssea e em hepatócitos de ratos seguiu a metodologia proposta por MacGregor et al. (1987) e Tates et al. (1980), respectivamente. Foram analisados 1000 eritrócitos policromáticos (PCEs) e 1000 hepatócitos intactos, por animal, em microscópio de luz, com aumento de 1000 x (imersão). O material foi analisado em teste cego e as lâminas foram decodificadas ao final das análises. A porcentagem de redução na frequência de eritrócitos policromáticos ou hepatócitos micronucleados foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990).

Medula óssea

Os animais foram divididos em 4 grupos com 6 animais cada (Figura 1). Os grupos 1 e 2 foram tratados com água, via oral (4 mL/dia, por gavagem) durante todo período experimental. No 15º dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal com NaCl 0,9% e ENU (50 mg/kg p.c), respectivamente. Os grupos 3 e 4 foram tratados com solução aquosa do cogumelo, via oral (AB 99/29 - 60º C, 4 mL/dia, por gavagem), durante todo o período experimental. No 15º dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal com ENU (50 mg/kg p.c) e NaCl 0,9%, respectivamente. Os animais foram sacrificados 24 horas após o tratamento para análise de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs).

Fígado

Os animais foram divididos em 4 grupos com 8 animais cada (Figura 2). Os grupos 1 e 2 foram tratados com água, via oral (4 mL/dia, por gavagem), durante 11 dias. No 1º dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal com NaCl 0,9% e DEN (50 mg/kg p.c), respectivamente. Os grupos 3 e 4 foram tratados com solução aquosa do cogumelo, via oral (AB 99/29 - 60º C, 4 mL/dia, gavagem), durante 11 dias. No 1º dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal com DEN (50 mg/kg p.c) e NaCl 0,9%, respectivamente. Para estimular a divisão celular, requisito para a formação de MN, foi realizado hepatectomia parcial (HP) no 8º dia. 3 dias após a HP os animais foram sacrificados para avaliação de hepatócitos micronucleados.

Teste de dano no DNA (teste do cometa)

O teste do cometa em sangue periférico, bexiga, cólon e fígado, foram realizados com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988) e modificações de Hartmann e Speit (1995). 5 µl de sangue periférico foram coletados do plexo venoso periorbital dos animais, 3 h após o tratamento. A obtenção das células da bexiga, do cólon e do fígado seguiu os protocolos descritos por Balakrishnan et al. (2002), Bazo et al. (2002) e Barbisan et al. (2003), respectivamente. Após isolamento das células, 10 µl das suspensões celulares foram misturados a 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), colocadas sobre lâminas previamente revestidas por uma camada de agarose normal (1,5%) e cobertas com lamínula. Em seguida, o material passou por um processo de lise, eletroforese e neutralização. A análise dos cometas foi realizada

em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay 2.2: Perspective Instruments, Suffolk, UK). Foram analisadas 50 células por animal, em aumento de 400x e dois parâmetros foram utilizados como indicativos de danos no DNA: *tail moment* (comprimento da cauda x quantidade de DNA na cauda) e *tail intensity* (porcentagem de DNA na cauda do cometa)(Hartmann et al., 2003).

Os animais foram divididos em 10 grupos com 8 animais cada (Figura 3). Os grupos de 1 a 5 foram tratados com água via oral (4 mL/dia, por gavagem), durante 15 dias consecutivos e receberam tratamento com NaCl 0,9%, ENU (50 mg/kg p.c, i.p), MNU (30 mg/kg p.c, i.p), DMH (40 mg/kg p.c, s.c) e DEN (20 mg/kg p.c, i.p), respectivamente, no 15º dia. Os grupos de 6 a 10 foram tratados com solução aquosa do cogumelo via oral (AB 99/29 - 60º C, 4 mL/dia, por gavagem), durante 15 dias e receberam tratamento com NaCl 0,9%, ENU (50 mg/kg p.c, i.p), MNU (30 mg/kg p.c, i.p), DMH (40 mg/kg p.c, s.c) e DEN (20 mg/kg p.c, i.p), respectivamente, no 15º dia. O sangue periférico foi coletado do plexo orbital após 3 h do tratamento com ENU. Os animais foram sacrificados 4 h após os tratamentos com MNU, DMH e DEN para a remoção dos órgãos e isolamento das células da bexiga, cólon e fígado para análise de danos no DNA.

Teste de focos de criptas aberrantes

O teste de focos de criptas aberrantes (FCA), para avaliar as lesões pré neoplásicas do cólon, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Bazo et al. (2002). A identificação das criptas aberrantes seguiu o método proposto por Bird (1987), que consiste da análise microscópica da mucosa do cólon de rato,

corada com azul de metileno. A observação foi feita diretamente no tecido distendido sobre uma lâmina de vidro, sem o processamento do material e inclusão em parafina. As criptas aberrantes são identificadas por seu tamanho aumentado, aspecto mais escuro, abertura luminal variando desde circular até alongada ou tortuosa, e pela camada de células espiteliais mais espessas em relação às normais circunvizinhas (Fenoglio-Preiser e Noffsinger, 1999)

Os animais foram divididos em 4 grupos com 8 animais cada (Figura 4). Grupo 1 (controle negativo) recebeu água, durante todo período experimental e EDTA (0.05 ml/10g p.c, s.c), 2 doses por semana, por 2 semanas (semanas 2 e 3). Grupo 2 (controle positivo) recebeu água, durante todo período experimental, e foram tratados, por via subcutânea, com 4 doses de DMH (40 mg/kg), 2 doses por semana por 2 semanas (semanas 2 e 3). Grupo 3 foi tratado com a solução aquosa do cogumelo, via oral (AB 99/29 – 60º C), como água de beber, uma semana antes e durante o tratamento com DMH (2ª. e 3ª. semanas). Grupo 4 foi tratado com a solução aquosa do cogumelo via oral (AB 99/29 – 60º C), como água de beber, após o tratamento com DMH (2ª. e 3ª. semanas). No final da 12ª. semana, os animais foram sacrificados para coleta do cólon. O peso corpóreo e o consumo de ração e água foram registrados a cada 2 dias, durante o período experimental.

Análise estatística

A frequência de células micronucleadas em medula óssea ou fígado foi comparada pelo teste do Qui-quadrado (Pereira, 1991). Para o teste do cometa, as médias dos parâmetros mensurados foram avaliados por Análise de Variância

(ANOVA). O número total de focos de criptas aberrantes, de criptas aberrantes por foco e a relação cripta/foco foram comparados por Kruskal-Wallis. $P < 0.05$ foi o valor considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A Tabela I mostra o efeito do cogumelo *A. brasiliensis* sobre os danos no DNA, quimicamente induzidos em sangue periférico e em múltiplos órgãos (bexiga, cólon e fígado) de ratos pré-tratados com a solução aquosa do cogumelo. Os resultados mostram que a solução aquosa do *A. brasiliensis* (60° C) não exerceu efeito antigenotóxico nos grupos pré-tratados com o cogumelo e os agentes químicos órgãos-alvo. Da mesma forma, não foi observado efeito genotóxico nos grupos tratados somente com a solução aquosa do *A. brasiliensis* (60° C).

A Tabela II mostra as freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) e hepatócitos micronucleados de ratos tratados com a solução aquosa do *A. brasiliensis* (60° C) + ENU (50 mg/kg) para medula óssea ou DEN (50 mg/kg) para o fígado. O pré-tratamento com *A. brasiliensis* levou a uma redução estatisticamente significativa na freqüência de PCEMN induzidos pelo ENU em medula óssea, mas esse efeito não foi observado em hepatócitos de ratos tratados com *A. brasiliensis* (60° C) + DEN, quando comparados com os respectivos grupos controles positivos. Os resultados mostram, também, que as freqüências de PCEMN e hepatócitos micronucleados de ratos tratados somente

com a solução aquosa do *A. brasiliensis* não foram estatisticamente diferentes dos grupos controles negativos.

A Tabela III mostra o efeito do cogumelo *A. brasiliensis* na indução de focos de criptas aberrantes (FCA). Os resultados mostram que não foram detectados focos de criptas aberrantes (FCA) nos animais do grupo controle negativo. Os pré e pós-tratamentos com a solução aquosa do *A. brasiliensis* (60°C) não exerceram efeito significativo sobre o número total de focos de criptas aberrantes e tampouco sobre o número total de criptas aberrantes induzidas pela DMH. Entretanto, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de focos com 4 a 6 criptas aberrantes, no pós-tratamento, quando comparada com o grupo tratado somente com DMH.

O controle do consumo de ração, água e peso dos animais não revelaram diferença significativa entre os grupos tratados e controle negativo (dados não apresentados).

Tabela I – Frequência de eritrócitos policromáticos e hepatócitos micronucleados induzidos pelo ENU (50 mg/kg) em medula óssea e pela DEN (50 mg/kg) em hepatócitos de ratos, após pré-tratamento com solução aquosa do cogumelo *Agaricus brasiliensis* (AB 99/29 – 60º C).

Tratamento	Número de células analisadas	MN		Redução (%)
		No.	%	
Medula óssea				
NaCl 0,9% ^a	6000	19	0.19	37.5*
ENU ^b (50mg/kg)	6000	83	0.83	
<i>A. brasiliensis</i> (60º C) + ENU	6000	59	0.59	
<i>A. brasiliensis</i> (60º C)	6000	20	0.20	
Fígado				
NaCl 0,9% ^a	8000	10	0.10	20.3
DEN ^c (50mg/kg)	8000	84	0.84	
<i>A. brasiliensis</i> (60º C) + DEN	8000	69	0.69	
<i>A. brasiliensis</i> (60º C)	8000	05	0.05	

^a Controle negativo

^b N-etil-N-nitrosuréia (Controle positivo - medula óssea)

^c N-dietilnitrosamina (Controle positivo - fígado)

* p< 0.05

Tabela II. Efeito do *Agaricus brasiliensis* na migração de danos no DNA detectados pelo ensaio cometa em células de sangue periférico e de múltiplos órgãos (bexiga, cólon e fígado) de ratos pré-tratados com a solução aquosa do cogumelo (AB 99/29 – 60º C) e os agentes órgãos-alvo.

Tratamento	Parâmetros analisados	
	<i>Tail moment</i> ± S.D	<i>Tail intensity</i> ± S.D
Sangue periférico		
NaCl 0,9% ^a	0.87 ± 0.33	7.22 ± 1.77
ENU ^b (50mg/kg)	2.75 ± 0.60	17.16 ± 3.89
<i>A. brasiliensis</i> (60º C) + ENU	2.29 ± 0.71	15.04 ± 3.69
<i>A. brasiliensis</i> (60º C)	0.76 ± 0.37	6.80 ± 2.43
Bexiga		
NaCl 0,9% ^a	0.43 ± 0.14	4.20 ± 1.38
MNU ^c (30mg/kg)	1.55 ± 0.24	8.36 ± 1.46
<i>A. brasiliensis</i> (60º C) + MNU	3.17 ± 1.74	17.81 ± 7.70
<i>A. brasiliensis</i> (60º C)	1.15 ± 0.58	8.73 ± 2.84
Cólon		
NaCl 0,9% ^a	0.38 ± 0.06	3.92 ± 0.69
DMH ^d (40mg/kg)	3.97 ± 1.29	19.06 ± 5.80
<i>A. brasiliensis</i> (60º C) + DMH	1.56 ± 0.32	11.80 ± 2.74
<i>A. brasiliensis</i> (60º C)	0.44 ± 0.12	4.20 ± 0.87
Fígado		
NaCl 0,9% ^a	0.33 ± 0.14	3.09 ± 0.94
DEN ^e (20mg/kg)	1.98 ± 0.42	10.10 ± 1.71
<i>A. brasiliensis</i> (60º C) + DEN	1.89 ± 0.59	10.59 ± 3.17
<i>A. brasiliensis</i> (60º C)	0.37 ± 0.12	2.95 ± 0.84

^a Controle negativo

^b N-etil-N-nitrosuréia (Controle positivo - sangue periférico)

^c N-metil-N-nitrosuréia (Controle positivo - bexiga)

^d N,N'-dimetilhidrazina (Controle positivo - cólon)

^e N-dietilnitrosamina (Controle positivo - fígado)

Tabela III – Número e distribuição de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de ratos tratados com a solução aquosa do cogumelo *Agaricus brasiliensis* (AB 99/29 – 60° C) e com a dimetilhidrazina (DMH).

Tratamento	Focos de criptas aberrantes (FCA)				Total de CA/FCA		Total de
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 a 6 criptas	FCA	CA ^c	
EDTA ^a	0	0	0	0	0	0	0
DMH ^b (40 mg/kg)	30	45	22	13	110	241	2,19
<i>A. brasil.</i> + DMH	36	48	30	06	120	246	2,05
DMH + <i>A. brasil.</i>	22	64	29	01*	116	241	2,07

^aControle negativo

^b Controle positivo

^c Criptas abrrantes

* p < 0,05

DISCUSSÃO

O cogumelo *Agaricus brasiliensis*, recentemente, tem recebido muita atenção, em decorrência de suas propriedades antitumorais. Vários polissacarídeos e complexos-polissacarídicos foram isolados deste cogumelo mostrando atividade antitumoral (Itoh et al., 1994, Ito et al., 1997; Wasser et al, 2002). A investigação do potencial antimutagênico do cogumelo *A. brasiliensis* foi iniciada por Osaki et al. (1994) utilizando o teste de Ames, e o benzo[a]pireno como indutor de mutagenêse. Em 2001, Delmanto et al. e Menoli et al. relataram o potencial antimutagênico do *A. brasiliensis* em estudos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, utilizando uma mistura de linhagens do cogumelo contra mutações quimicamente induzidas por diferentes agentes alquilantes.

O presente trabalho, diferentemente dos acima citados, avaliou o mecanismo de antimutagenicidade de uma linhagem isolada do cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29), o que é importante, considerando que o efeito protetor de cogumelos varia de acordo com as diferenças genéticas entre linhagens (Colauto et al., 2002; Sugui et al., 2003). Por outro lado, como os efeitos quimioprotetores podem variar significativamente de um órgão para outro, como é o caso dos antioxidantes em geral, uma avaliação mais abrangente em diferentes órgãos, se faz necessária para que se tenha uma visão mais completa dessas variações no animal como um todo (Ito et al., 1996). Informações sobre o efeito da solução aquosa do *A. brasiliensis* (AB 99/29 - 60^o C) em diferentes órgãos mostram a

importância de se observar o comportamento do(s) componente(s) bioativo(s) em múltiplos órgãos de ratos Wistar.

A tabela I mostra claramente uma redução significativa na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) em ratos pré-tratados com a solução aquosa do cogumelo e posteriormente com o ENU (i.p). Do mesmo modo, um outro estudo conduzido em nosso laboratório, mostrou que o pré-tratamento de camundongos com a mesma solução aquosa do *A. brasiliensis* (AB 99/29 - 60° C) reduziu de forma significativa a frequência de PCEMN induzidos pelo N-metil-N-nitrosuréia (MNU) (dados ainda não publicados). Essas observações sugerem que o efeito protetor medular do *A. brasiliensis* é efetivo, independente da espécie de roedor utilizada e que, aparentemente, a ação protetora do cogumelo não é agente-específica, uma vez que existe uma proteção medular efetiva tanto contra mutações induzidas pelo ENU como pelo MNU. Os resultados da Tabela I mostram, também, a frequência de hepatócitos micronucleados quimicamente induzidos pela DEN. Os dados indicam que no fígado os compostos presentes na solução aquosa do *A. brasiliensis* não exerceram nenhuma atividade protetora contra os danos induzidos pelo agente alquilante utilizado. Assim, esse resultado reforça a nossa consideração acima de que, os compostos presentes na solução aquosa parecem ter um caráter órgão-específico, pelo menos na etapa de iniciação da carcinogênese.

Avaliações de antimutagenicidade *in vivo*, geralmente, são realizadas com células hematopoiéticas utilizando o teste do micronúcleo, em decorrência da dificuldade de se realizar essa avaliação em outros órgãos, como por exemplo, aqueles revestidos de células epiteliais (bexiga e cólon). Desta maneira, o teste

do cometa tem sido cada vez mais utilizado em avaliações de mecanismo de ação de compostos quimioprotetores (Alves de Lima et al., 2001; Menoli et al., 2001). Essa metodologia tem a vantagem de ser realizada facilmente em diferentes tecidos. No presente trabalho, o efeito do cogumelo *A. brasiliensis* foi avaliado em medula óssea, sangue periférico e em múltiplos órgãos (bexiga, cólon e fígado) de ratos Wistar, utilizando o teste do cometa.

A tabela II apresenta esses dados, mostrando um panorama geral do efeito da solução aquosa do cogumelo sobre os danos induzidos no DNA por diferentes agentes químicos (ENU, MNU, DMH e DEN). A ausência de efeito protetor em todos os órgãos avaliados sugere que a inibição de danos primários, induzidos no DNA, não seja o modo de ação preferencial do cogumelo em estudo. Entretanto, esse fato pode indicar que o(s) componente(s) ativo(s) do cogumelo pode(m) estar atuando numa fase posterior à indução da lesão.

Focos de criptas aberrantes no cólon de roedores são lesões pré-neoplásicas consideradas como biomarcadores em testes de média duração para avaliação do potencial cancerígeno de agentes químicos, bem como para a identificação de quimioprotetores para o câncer (Schmelz et al., 2000). Assim, o cogumelo *A. brasiliensis* foi também investigado com relação ao seu possível potencial quimioprotetor sobre focos pré-neoplásicos induzidos pela DMH em cólon de ratos. Os resultados mostraram que o pré e o pós-tratamento com a solução aquosa do *A. brasiliensis* não exerceram efeito significativo sobre o número total de focos de criptas aberrantes, e tampouco sobre o número total de criptas aberrantes induzidas pela DMH. No entanto, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de focos com 4 a 6 criptas aberrantes, no pós-

tratamento com o *A. brasiliensis* (Tabela III). De acordo com a literatura, o aumento no número de FCA pode refletir a etapa de iniciação da carcinogênese do cólon, enquanto que o aumento progressivo no número de criptas/FCA pode corresponder à etapa de promoção (Zhang et al., 1992; Magnuson et al., 1993; Fenoglio-Preiser e Noffsinger, 1999). A proteção observada na etapa de promoção da carcinogênese poderia, por exemplo, ser decorrente de uma supressão na expansão clonal de células iniciadas, uma vez que, reduziu, de forma significativa, o número de criptas por foco. Dessa forma, pode-se sugerir que a ação desse cogumelo é, aparentemente, exercida numa fase pós-iniciação.

Uma observação em nossos resultados, com relação ao fígado, mostra que os compostos presentes na solução aquosa do *A. brasiliensis* não exercem efeito quimioprotetor contra a indução de danos primários no DNA e nem na modulação da frequência de hepatócitos micronucleados induzidos pela DEN. No entanto, Pinheiro et al. (2003) relatou que o cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29) exerce um efeito inibidor sobre o desenvolvimento de focos hepáticos alterados (GST-P⁺ e TGF- α ⁺) nos animais iniciados pela DEN. A glutathione-S-transferase, forma placentária (GST-P), é reconhecida como um dos melhores marcadores dos focos pré-neoplásicos em fígado de ratos (Ito et al., 1989) e, a redução do fator de crescimento transformante α (focos TGF- α ⁺) pode indicar uma importante propriedade quimioprotetora, uma vez que esse fator pode agir como um promotor autócrino durante a hepatocarcinogênese (Kaufmann et al., 1992; Burr et al., 1996). Dessa forma, como sugerido pelos resultados encontrados por nós no teste de focos de criptas aberrantes, Pinheiro et al. (2003) também observaram um efeito quimioprotetor do cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29) na etapa de

promoção da hepatocarcinogênese quimicamente induzida em fígado de ratos Wistar.

A inibição da proliferação celular de células iniciadas pode ser decorrente de um aumento na taxa de apoptose ou por estimulação imunológica. Nesse contexto, um estudo realizado por Fujimiya et al. (1998) mostrou que o *A. brasiliensis* contém uma proteoglicana solúvel (ATF – acid-treated fraction) que não só possui efeito antitumoral seletivo indireto, mediado por ativação de células *natural killer* em camundongos, mas um efeito direto inibindo o crescimento de células tumorais, *in vitro*, pela indução de apoptose.

Com base nos resultados apresentados, os nossos dados permitem sugerir que a solução aquosa do cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29) possui compostos que reduzem significativamente a frequência de células micronucleadas da medula óssea de ratos Wistar, bem como atuam inibindo a expansão clonal de células iniciadas no cólon dos animais.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

REFERÊNCIAS

Alves de Lima PL, Delmanto RD, Sugui MM, Eira AF, Salvadori DMF, Speit G, Ribeiro LR. 2001. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*. *Mutat Res* 496:23-32.

Balakrishnan S, Uppala PT, Rupa DS, Hasegawa L, Eastmond DA. 2002. Detection of micronuclei, cell proliferation and hyperdiploidy in bladder epithelial cells of rats treated with o-phenylphenol. *Mutagenesis* 17:89-93.

Barbisan L.F, Scolastici C, Miyamoto M, Salvadori DMF, Ribeiro LR, Eira AF, Camargo JLV. 2003. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Gen Mol Res* 2:295-308.

Bazo AP, Rodrigues MAM, Sforcin JM, Camargo JLV, Ribeiro LR, Salvadori DMF. 2002. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen* 22:183-194.

Bird RP. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett* 37:147-51.

Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME. 1999. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med* 221:281-93.

Burr AW, Toole K, Mathew J, Hines JE, Chapman C, Burt AD. 1996. Transforming growth factor- α expression is altered during experimental hepatocarcinogenesis. J Pathol 179:276-82.

Colauto NB, Dias ES, Gimenes MA, Eira AF. 2002. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by rapd. Braz J microbial 33:131-3.

Delmanto RD, Alves de Lima PL, Sugui MM, Da Eira AF, Salvadori DMF, Speit G, Ribeiro LR. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. Mutat Res 496:15-21.

Ebina T. 2005. Antitumor effects of intratumoral injection of basidiomycetes preparations. Gan To Kagaku Ryoho 32:1654-56.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. 1999. Aberrant crypt foci: a review. Toxicol Pathol 27:632-42.

Fujimiya Y, Sussuki Y, Oshiman KI, Kobori H, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R. 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. Cancer Immunol Immunother 46:147-59.

Grüter A, Friederich U, Wurgler FE. 1991. The mutagenicity of edible mushroom in a histidine-independent bacterial test system. Food Chem Toxicol 29:159-165.

Hartmann A., Speit G. 1995. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). Mutat Res 346:49-56.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. Mutagenesis 18:45-51.

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) "Himematsutabe" and its mechanisms in tumor-bearing mice. Anticancer Res 17:277-84.

Ito N, Imaida T, Hasegawa R, Tsuda H. 1989. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. Crit Rev Toxicol 19:385-415.

Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, Shirai T. 1996. Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassay for carcinogens and chemopreventive agents. Exp Toxic Pathol 48:113-119.

Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. 1994. Inhibitory action of a (1(6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill ("himematsutake") on a Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. Jpn J Pharmacol 66:265-71.

Kauffman WK, Zang Y, Kaufmann DG. 1992. Association between expression of transforming growth factor alpha and progression of hepatocellular foci to neoplasms. Carcinogenesis 13:1481-83.

MacGregor JT, Heddle JA., Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tia RR, Wild D. 1987. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutat Res 189:103-12.

Magnuson BA, Carr I, Bird RD. 1993. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. Cancer Res 53:4499-04.

Manoharan K, Banerjee MR. 1985. β -carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. Cell Biol Int Rep 9:783-789.

Menoli RCA., Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordão BQ. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. Mutat Res 496:5-13.

Mizuno T. 2002. Medicinal properties and clinical effects on *Agaricus blazei* Murrill. Int J Med Mushrooms 4:299-312.

Osaki Y, Kato T, Yamamoto K, Okubo J, Miyazaki T. 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. Yakugaku-Zasshi 114:342-50.

Pereira CAB. 1991. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética, In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MA, Montelleone-Neto La R, editores. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. São Paulo: FCA, p.113-21.

Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira, AF, Barbisan LF. 2003. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. Food Chem Toxicol 41:1543-50

Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. 2001. Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. Int J Med Mushrooms 3:361-94.

Sasaki, Y.F., Saga, A., Akasaka, M., Ishibashi, S., Kumiko, Y., Su, Y.Q., Matsusuka, N., Tsuda, S. 1998. Detection of in vivo genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple organs. Mutat Res 419, 13-20.

Schmelz EM, Sullards MC, Dillehay DL, Merrill AHJR. 2000. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. J Nutr 130:522-27.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-91.

Sugui MM, Alves de Lima PL, Delmanto RD, Eira AF, Salvadori DMF, Ribeiro LR. 2003. Antimutagenic effect of Lentinula edodes (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. Food Chem Toxicol 41:555-60.

Tates AD, Neuteboom I, Hofker M, den Engelse L. 1980. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. Mutat Res 74:1-20.

Wasser SP, Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Crit Rev Immunol 19:65-96.

Wasser SP, Didukh M, Amazonas MALL, Nevo E, Stamets P, Eira AF. 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? Int J Med Mushroom 4:267-90.

Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brookman HE. 1990. Antimutagenic profiles for some model compounds. Mutat Res 238:57-85.

Zhang XM, Stamp D, Minkin S, Medline A, Corpet DE, Bruce WR, Archer MC.
1992. Promotion of crypt foci and cancer in rat colon by thermolyzed protein. J
Natl Cancer Inst 84:1026-30.

Legenda para as Figuras

Fig. 1- Protocolo experimental para avaliação do efeito antimutagênico do cogumelo *Agaricus brasiliensis* em células de medula óssea de ratos Wistar.

Fig. 2- Protocolo experimental para avaliação do efeito antimutagênico do cogumelo *Agaricus brasiliensis* em células de fígado de ratos Wistar.

Fig. 3- Protocolo experimental para avaliação do potencial genotóxico e/ou antigenotóxico do cogumelo *Agaricus brasiliensis* em células de sangue periférico, bexiga, cólon e fígado de ratos Wistar utilizando o ensaio cometa.

Fig. 4- Protocolo experimental para avaliação do efeito do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre focos de criptas aberrantes induzidos pela N'N-dimetilhidrazina (DMH) em cólon de ratos Wistar.

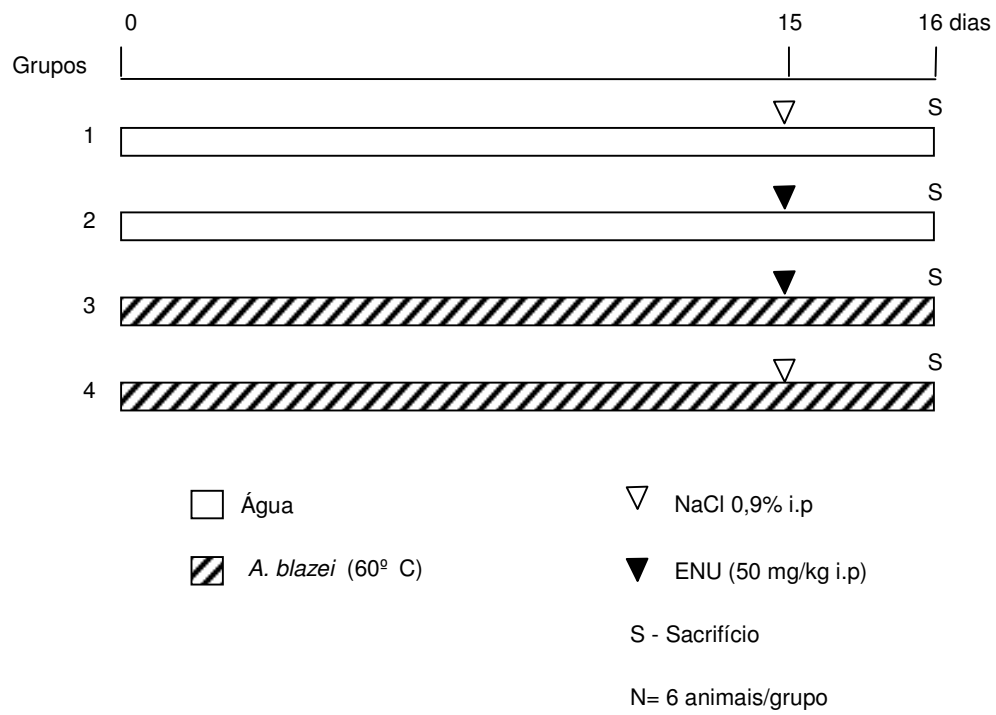


Fig. 1

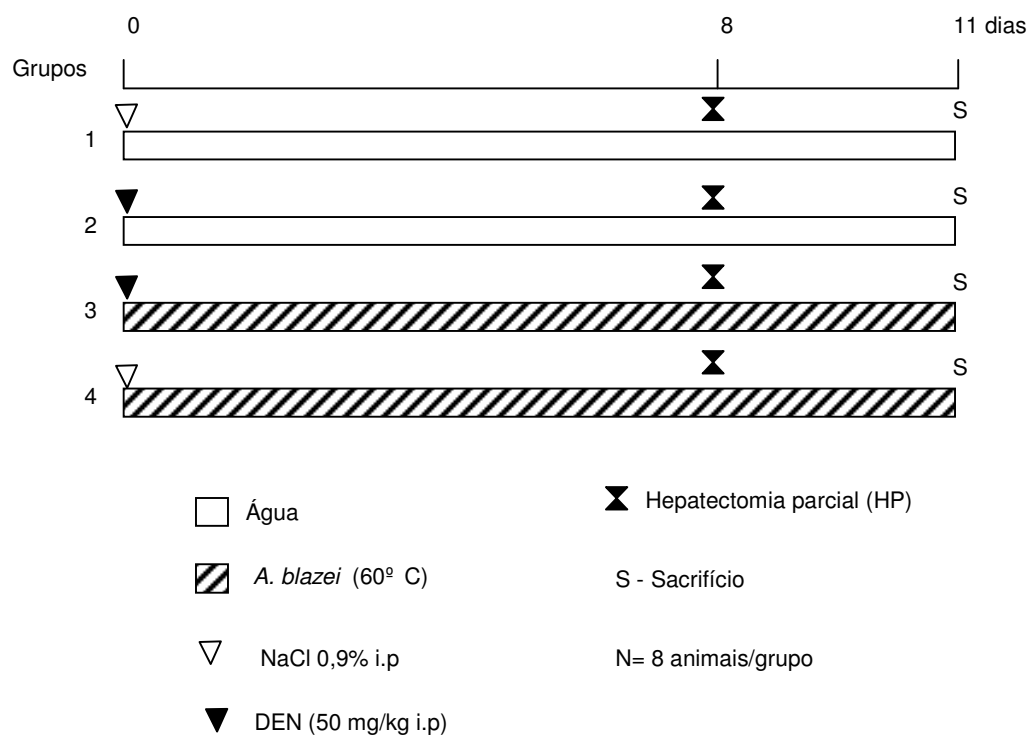


Fig. 2

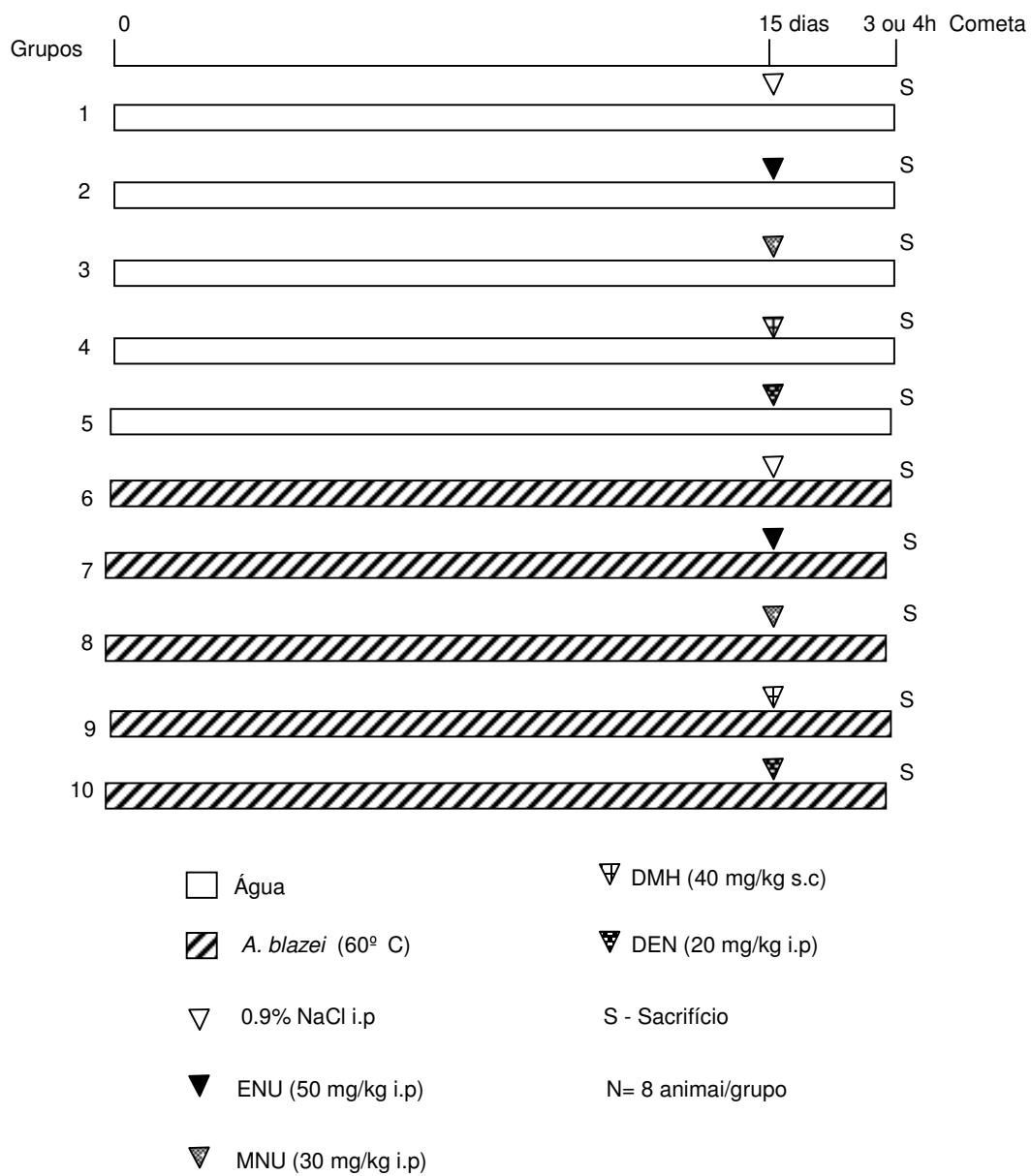


Fig. 3

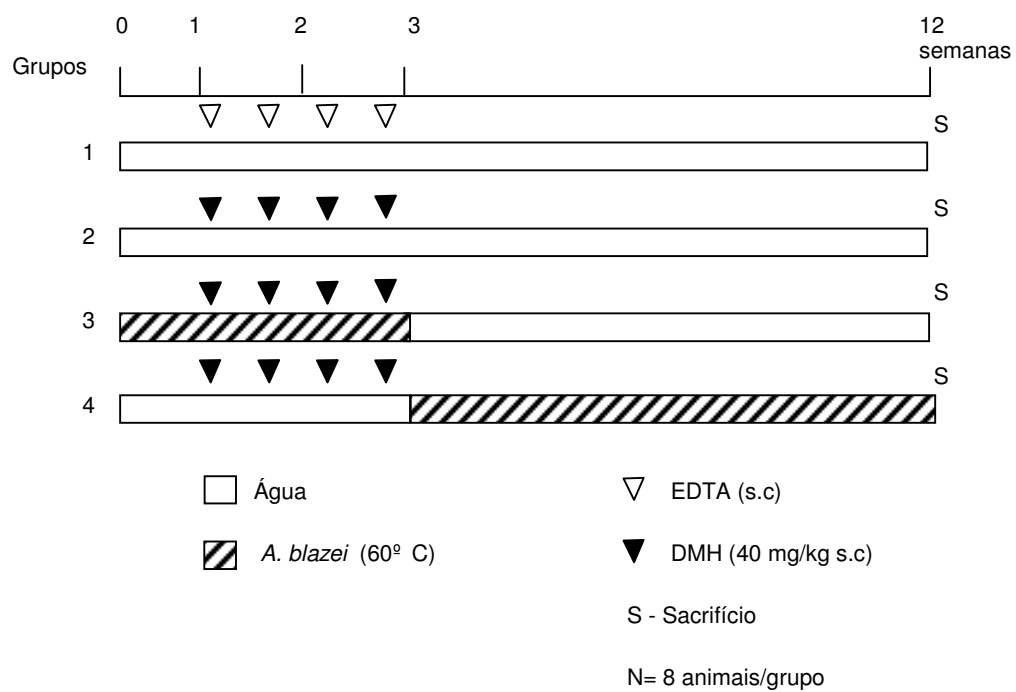


Fig. 4

IV- Manuscrito 2

Antigenotoxic effect of different organic extracts of *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. mushroom determined *in vitro* by the comet assay [#]

M.M. Sugui ^{a,*}, P.L. Alves de Lima ^a, A.I.M. Petricio ^a, E.F. Guimarães ^b, D.M.F. Salvadori ^c, L.R. Ribeiro ^c

^a TOXICAN – Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena, Depto. de Patologia, Faculdade de Medicina – UNESP, 18600-000 Botucatu – SP, Brazil.

^b Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia, IME, RJ, Brazil.

^c Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina – UNESP, 18600-000 Botucatu – SP, Brazil.

* Correspondência: Marina Mariko Sugui, Rua: José Nelson Nasrauí nº. 300, 17.511-490, Marília - SP, Brazil, Tel. 55-14-3425-2201, Fax: 55-14-3815-2348.

E-mail: masugui@hotmail.com

De acordo com as normas da Revista *Toxicology in Vitro*

Abstract

Chemoprevention opens new perspectives in the prevention of cancer and other degenerative diseases. It has been suggested that mushrooms have bioactive components some of which present antitumor activity and antimutagenic or anticarcinogenic properties. We have previously shown that aqueous extract of mixture lineages of *A. brasiliensis* S. Wasser et al. mushroom (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem.) are effective against mutagenicity induced by alkylant agent *in vivo* and *in vitro*. As the identification of active compound(s) is a highly desirable alternative, we conducted this study with different organic extracts (dichloromethane, hexane and ethyl acetate) of *A. brasiliensis* (lineage AB 99/29) in an *in vitro* system for their protective effect. Genetic damage was determined by a direct-acting alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS), in non drug-metabolizing (CHO-k1) and drug-metabolizing (HepG2) cell lines, using comet assay. The cell lines were pre-treated with extracts of mushroom and MMS. The data obtained showed that the different extracts of *A. brasiliensis* were antigenotoxic under the conditions tested in CHO-k1 cells, but this effect was not observed in HepG2 cells. These results suggest that different effects can be obtained from *A. brasiliensis* mushroom (AB 99/29) with regard to types of cell lines and cell metabolism.

Keywords: Antigenotoxicity; *Agaricus brasiliensis*; CHO-k1 cells; HepG2 cells; MMS; Comet assay

1. Introduction

Mushrooms are widely recognized as good sources of bioactive substances that may be useful for human medicine (Wasser and Weiss, 1999). In this context, *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem.) is an edible mushroom native to southern Brazil and is popularly known as “Himematsutake” in Japan. At present, *A. brasiliensis* is frequently consumed as food or tea in different parts of the world, due to its potent medicinal properties. Although this mushroom is popularly used in the treatment of various diseases (e.g., stress, diabetes, gastric problems and osteoporosis), its chemical composition has not yet been completely elucidated. Thus several extracts of mushroom obtained by different processes and solvents have been assessed through the years.

Kawagishi et al. (1989) were the first to isolate and study the active compounds found in the fruiting body of *A. brasiliensis*, identifying polysaccharides with antitumor activity. This activity was detected in the fraction III-2b, which contains a (1→6) β -D-glucan-protein, a complex consisting of 43.3% protein and 50.2% carbohydrate. Using acid-treated fraction (ATF), Fujimiya et al. (1998) demonstrated inhibition tumor cell growth *in vitro* by inducing apoptotic pocessing. Osaki et al. (1994) showed that various fractions (IIa, IIb, IIc and IId) of mushroom inhibited the mutagenicity of benzo(a)pyrene (B(a)P), and that linoleic acid was found to be the main substance associated with such activity. Other studies with isolated fractions of the fruiting body of *A. brasiliensis* showed that some of them exhibit antimutagenic and anticlastogenic effects (Delmanto et al.,2001; Menoli et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Bellini et al., 2003; Luiz et al., 2003),

anticarcinogenic properties (Takeda et al., 2000) and immunostimulative activities (Kawagishi et al., 1989; Itoh et al., 1994; Ito et al., 1997; Mizuno et al., 1990, 1998). It seems to suggest that the *A. brasiliensis* mushroom may be important both as a nutritionally functional food and as a prophylaxis against diseases such as cancer (Mizuno et al., 1998; Wasser and Weis, 1999). Nevertheless, scientific knowledge about its biological properties is still insufficient.

Thus, the aim of the present *in vitro* study was to evaluate the antigenotoxic effects of different organic extracts of *A. brasiliensis* mushroom (lineage AB 99/29) on Chinese hamster ovarian cells (CHO-k1, non drug-metabolizing) and human hepatoma cells (HepG2, metabolizing) against DNA damage induced by the agent methyl methanesulfonate (MMS) by comet assay.

2. Material and methods

2.1 Preparation of A. brasiliensis extracts

The fruiting bodies of the *A. brasiliensis* mushroom, lineage AB 99/29, were obtained from the Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. The mushroom extracts were kindly provided by Dr. José Daniel Figueroa Villar, Dr. Carlos Alberto Riehl and Ms. Evelyn de Freitas Guimarães from the Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia, IME, Rio de Janeiro, Brazil. Briefly, *A. brasiliensis* (AB 99/29) aqueous solution (2.5 %) was prepared using 5g of the powdered mushroom added to 200 mL of filtered water. Next the solution was warmed up to 60° C, and

the temperature was maintained (thermometer) for 15 min before filtering. Subsequently, sequential extractions (liquid-liquid) from the aqueous solution were obtained using solvents with different polarities. These fractions were denominated: dichloromethane (DAb), hexane (HAb), ethyl acetate (EAb) and aqueous phase (APAb).

2.2 DNA damage-inducing agents

DNA damage was induced in CHO-k1 and HepG2 cells using methyl methanesulfonate (MMS, CAS No. 66-27-3, Sigma), a direct-acting alkylating agent. MMS was dissolved immediately before use in medium without serum and used at a final concentration of 1 µg/mL in cultures.

2.3 Cell lines

The CHO-k1 cell line used in this study provided by Dr. Mário Sérgio Mantovani, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil. HepG2 cells were acquired from Dr. Siegfried Knasmüller, Institute of Cancer Research, University of Vienna, Austria. CHO-k1 cells were grown in HAM-F10 medium (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and HepG2 cells were grown in DMEM 4.5g/L glucose medium (Gibco),

supplemented with 15% fetal bovine serum (Gibco), both cultured as monolayer in 75 cm² flasks. Cells stocks were maintained at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. CHO-k1 and HepG2 both adherent cells were seeded in 24-well plates at a concentration of 0.25x10⁶ cells/mL/well 24 h prior to experiments.

2.4 Cytotoxicity assay

To investigate whether DNA effects detected in the comet assay are accompanied by cytotoxic effects, cell viability was determined by Tripan blue dye exclusion conducted according to Elia et al., (1993). Briefly, 0.25x10⁶ of CHO-k1 and HepG2 cells were used per concentration tested. *A. brasiliensis* extracts (dichloromethane, hexane, ethyl acetate) and aqueous phase were tested ranging from 5000 to 50 µg/mL for 3 h in CHO-k1 cells or 24 h in HepG2 cells, at 5% CO₂ atmosphere at 37°C. A freshly prepared solution of 30 µL of trypan blue dye was mixed to 30 µL of each cell suspension and the viability of treatments was counted using a Neubauer chamber. Nonviable cells appear blue-stained and three independent repetitions were carried out for each treatment. The comet assay was conducted with >80% of viable cells (Tice et al., 2000) and with three non-cytotoxic chosen concentrations of *A. brasiliensis* extracts (50, 200 or 2500 µg/mL).

2.5 Comet assay

For the comet assay, 0.25×10^6 cells were seeded into 24 wells plates, cultivated overnight and then treated with *A. brasiliensis* extracts and MMS, for 2 h and 1 h in CHO-k1 and 24 h and 6 h in HepG2 cells, respectively. At the end of the treatment, cells were washed with fresh medium, trypsinized with 200 μ l trypsin (0.025%) and centrifuged at 2000 rpm for 3 min. After the cells were gently resuspended in 30 μ l fresh medium, 15 μ l of the suspension was immediately used for the test.

The comet assay was performed as described by Singh et al., (1988) with minor modifications (Hartmann and Speit, 1995). Briefly, a volume of the 15 μ l of cells of each treatment was added to 100 μ l of 0.5% low-melting-point agarose (LMA) at 37°C, layered into a precoated slide with 1.5% normal agarose, covered with a coverslip and placed in a refrigerator for 5 min to allow solidification of the LMA. Afterwards, slides were carefully immersed in lysing solution (100 mM EDTA, 10 mM Tris, 2.5 M NaCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, 1% Na-lauroyl-sarcosinate, pH 10). The slides were kept at 4°C for at least 24 h to lyse the cells. After lysis, the slides were placed in a horizontal gel electrophoresis chamber with alkaline buffer (1mM EDTA, 300mM NaOH, pH 13) for 20 min to permit DNA unwinding. Electrophoresis was performed for 20 min at 25 V(0.86 V/cm) and 300 mA. All of the steps were conducted under dim light to prevent the occurrence of additional DNA damage. After electrophoresis, the slides were rinsed with neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5). Finally, they were stained with 50 μ l ethidium bromide (20 μ g/mL) and covered with a coverslip. Images of 50 cells per treatment were analyzed using a fluorescence microscope at 200 X magnification. An image analysis system (Comet assay 2.2; Perceptive Instruments, Suffolk, UK)

was used to determine DNA damage. Two parameters were estimated to indicate DNA migration: tail moment (percentage of DNA in the tail x tail length) and tail intensity (percentage of DNA in the tail) (Hartmann et al., 2003). All experiments were repeated three times in independent tests.

2.6 Statistical analysis

The data from Comet assay were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA). The significance level considered was $P < 0.05$.

3. Results

The relationships of *A. brasiliensis* extracts tested in both cell lines, at concentrations ranging from 50-5000 µg/mL, on cell viability assessed by trypan blue assay are shown in Figure 1 and Figure 2. The viability was greater than 90% in the negative control group in CHO-k1 and HepG2 cells. The viability of the treated cells (CHO-k1 and HepG2) with the different *A. brasiliensis* extracts was similar to control values for all tested concentrations.

The mean tail moment and tail intensity evaluated in the comet assay in both cell lines are shown in Table 1 and Table 2. Statistical analysis of the antigenotoxicity data indicated a significant difference ($p < 0.05$) in the pre-incubation treatment with the *A. brasiliensis* extracts in CHO-k1 cells when compared with the positive control group (MMS). On the other hand, the pre-

incubation treatment in HepG2 cells with the same extracts did not reduce DNA damage induced by MMS.

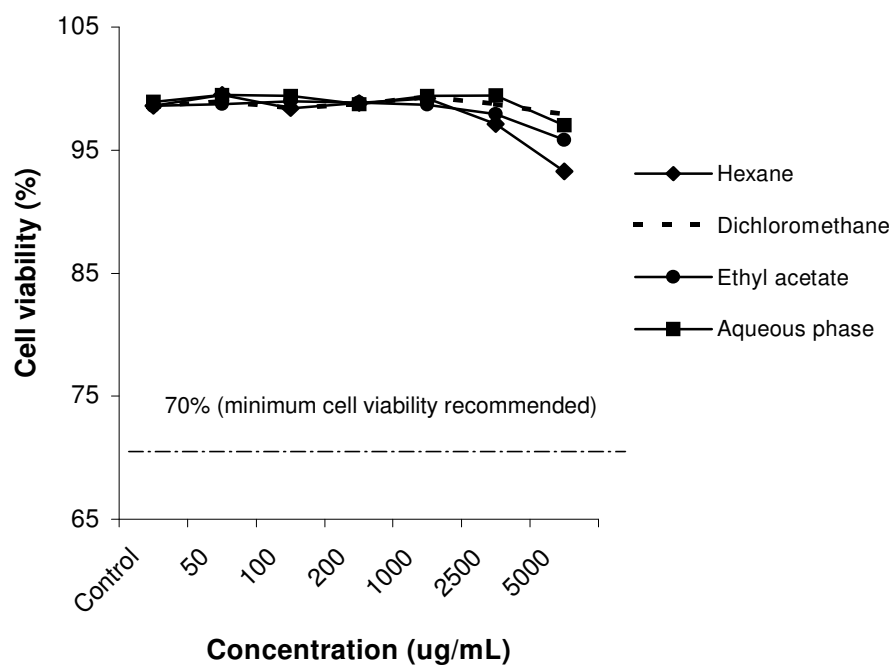


Figure 1- Effects of different concentrations of *A. brasiliensis* extracts on trypan blue dye exclusion test in CHO-k1 cells.

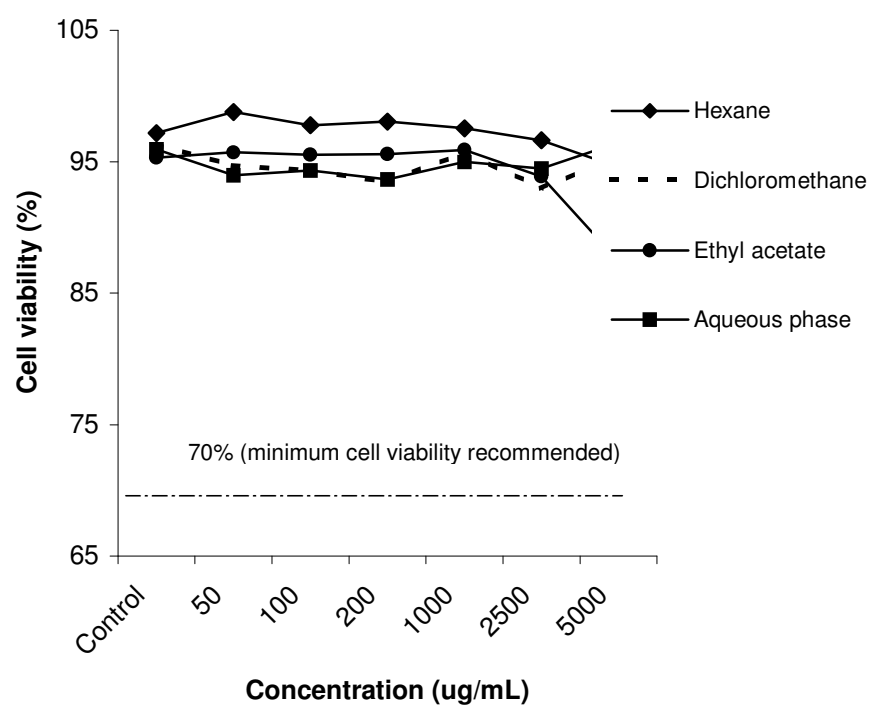


Figure 2- Effects of different concentrations of *A. blazei* extracts on Trypan blue dye exclusion test in HepG2 cells.

Table 1

The effect of *A. brasiliensis* extracts pre-treatments on DNA damage (tail moment and tail intensity) in the comet assay using CHO-k1 cells and subsequent exposure to MMS.

Treatment (<i>A. brasiliensis</i> extracts)	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	DNA damage	
		Tail moment $\pm$ S.D	Tail intensity $\pm$ S.D
Negative control		0.47 ± 0.05	4.13 ± 0.42
Positive control (MMS) ^a		3.08 ± 0.18	18.30 ± 1.08
DAb + MMS	50	$0.99 \pm 0.51^*$	$7.26 \pm 2.14^*$
	200	$0.90 \pm 0.42^*$	$7.05 \pm 2.68^*$
	2500	$0.88 \pm 0.52^*$	$6.93 \pm 2.80^*$
HAb + MMS	50	$0.75 \pm 0.32^*$	$5.95 \pm 1.94^*$
	200	$0.91 \pm 0.43^*$	$6.92 \pm 1.83^*$
	2500	$1.24 \pm 0.57^*$	$8.92 \pm 3.60^*$
EAb + MMS	50	$0.46 \pm 0.19^*$	$4.00 \pm 1.87^*$
	200	$0.74 \pm 0.45^*$	$6.16 \pm 2.42^*$
	2500	$1.31 \pm 0.45^*$	$8.72 \pm 2.76^*$
APAb + MMS	50	$0.70 \pm 0.33^*$	$5.18 \pm 1.53^*$
	200	$1.01 \pm 0.67^*$	$7.03 \pm 3.96^*$
	2500	$0.75 \pm 0.31^*$	$6.02 \pm 1.04^*$

^a Methyl methanesulfonate ($1\mu\text{g/mL}$)

DAb: Dichloromethane; HAb: Hexane; EAb: Ethyl acetate; APAb: Aqueous phase

* $P < 0.05$

Table 2

The effect of pre-treatments with *A. brasiliensis* extracts on DNA damage (tail moment and tail intensity) in the comet assay using HepG2 cells and subsequent exposure to MMS.

Treatment (<i>A. brasiliensis</i> extracts)	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	DNA damage	
		Tail moment $\pm$ S.D	Tail intensity $\pm$ S.D
Negative control		0.35 $\pm$ 0.08	2.43 $\pm$ 0.58
Positive control (MMS) ^a		4.24 $\pm$ 1.23	18.83 $\pm$ 3.21
DAb + MMS	50	3.10 $\pm$ 0.54	14.14 $\pm$ 2.96
	200	3.40 $\pm$ 1.60	15.98 $\pm$ 6.00
	2500	2.70 $\pm$ 0.32	14.59 $\pm$ 2.40
HAb + MMS	50	4.32 $\pm$ 2.61	18.47 $\pm$ 7.53
	200	4.39 $\pm$ 1.42	18.73 $\pm$ 3.97
	2500	3.84 $\pm$ 1.88	18.04 $\pm$ 5.37
EAb + MMS	50	3.38 $\pm$ 1.17	15.92 $\pm$ 4.36
	200	4.71 $\pm$ 1.42	19.94 $\pm$ 4.30
	2500	3.57 $\pm$ 1.00	16.87 $\pm$ 2.34
APAb + MMS	50	3.67 $\pm$ 0.95	16.47 $\pm$ 2.88
	200	3.55 $\pm$ 0.77	16.10 $\pm$ 1.99
	2500	5.05 $\pm$ 2.99	20.63 $\pm$ 7.99

^a Methyl methanesulfonate (1 $\mu\text{g/mL}$)

DAb: Dichloromethane; HAb: Hexane; EAb: Ethyl acetate; APAb: Aqueous phase

4. Discussion

The comet assay is a genotoxicity test which detects DNA strand breaks and alkali-labile sites in individual cells. It has already been used in both *in vitro* and *in vivo* studies to investigate DNA damage and repair induced by various agents in a variety of mammalian cells (McKelvey-Martin et al., 1993; Fairbairn et al., 1995; Hartmann and Speit, 1995; Speit and Hartmann, 1999). The comet assay is eminently suitable for assessing the ability of phytochemicals, for example, to protect cells against genotoxic agents (Dithie and Dobson, 1999).

In the present study, different organic extracts (dichloromethane, hexane, ethyl acetate) and aqueous phase of *A. brasiliensis* mushroom (AB 99/29) were tested for chemoprevention of MMS-induced primary DNA damage using comet assay *in vitro*. Different responses were seen with non drug-metabolizing (CHO-k1) and metabolizing (HepG2) cells by *A. brasiliensis* extracts treatments. These extracts demonstrated antigenotoxic effect in CHO-k1 cells, but not in HepG2 cells.

Antigenotoxic effects of organic and aqueous extracts of *A. brasiliensis* in CHO-k1 cells have not yet been described in the literature. On the other hand, studies with aqueous extracts of the *A. brasiliensis* have demonstrated no protective effect in V79 cells by comet assay (Oliveira et al., 2002; Gutierrez et al., 2004). This observation suggests that the reduction of MMS-induced primary DNA damage by organic extracts in CHO-k1 cells (Table 1) appears to happen only with fractions extracted from *A. brasiliensis*. In this context, protective effects in mutagenicity test (micronucleus and chromosomal aberration) were demonstrated

with other organic extracts in CHO-k1 cells by Luiz et al., 2003 and Bellini et al., 2005. Other studies have related the antimutagenic effect of aqueous extracts of *A. brasiliensis* *in vitro* against DNA damage induced by alkylating agents (Menoli et al., 2001, Oliveira et al., 2002; Bellini et al., 2003).

In recent years, new *in vitro* models have been developed that have a better predictive value for the identification of preventive compounds (Knasmüller et al., 2004). For example, human-derived hepatoma cells (HepG2), have maintained the activities of various phase I and phase II enzymes and better mimic the metabolism of genotoxins (Natarajan and Darroudi, 1991; Knasmüller et al., 1998). Our results in HepG2 cells showed lack of protective effect of different organic extracts of *A. brasiliensis* against the direct-acting alkylating agent MMS (table 2). A similar result was observed by Mlinaric et al. (2004), when studying activities of methanol extract of another edible medicinal mushroom (*Lactarius vellereus*) in HepG2 cells using a direct-acting mutagen (4-NQO) and comet assay. These results suggest that active compound(s) of mushrooms extracts were inactivated by cell metabolism of HepG2 cells. However, the lack of effect of *A. brasiliensis* on HepG2 cells needs to be better investigated with regard to the role of cell metabolism by the genotoxicity test. Bellini et al. (2005), when studying the protective effect of organic and aqueous extracts of *A. brasiliensis* in chromosomal aberration and micronucleus tests in CHO-k1 and HTC (rat hepatoma cells, metabolizing) cells, observed that all the extracts were anticlastogenic. However, one of the extracts (*n*-butanolic extract – BE) tested did not display genotoxicity in CHO-k1, but was genotoxic in HTC cells. These results suggested that all the

extracts contained protective substances, but in some cases they could show a genotoxic effect with regard to metabolism.

The genotoxic effect was not evaluated in this study, but several studies using organic or aqueous extracts of *A. brasiliensis* have reported lack of genotoxic effect of this mushroom (Menoli et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Guterrez et al., 2004).

In conclusion, our data show that the antigenotoxic effect cannot be excluded in *A. brasiliensis* mushroom (AB 99/29) in an *in vitro* system, but further investigations must be performed to study the active compound(s) of this mushroom towards the identification of substances isolated from the organic extracts and their action in cell metabolism.

Acknowledgments

This study was supported with grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and CNPq, Brazil.

References

Bellini, M.F., Giacomini, N.L., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S. 2003. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-K1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in Vitro* 17,465-469.

Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Matuo, R., Terezan, A.P., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S. 2005. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assay in CHO-k1 and HTC cells. Toxicology in Vitro. In press.

Delmanto, R.D., Alves de Lima, P.L., Sugui, M.M., Da Eira, A.F., Salvadori, D.M.F., Speit, G., Ribeiro, L.R. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. Mutation Research 496, 15-21.

Duthie, S.J., Dobson, V.L. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. European Journal Nutrition 38, 28-34.

Elia, M.C., Storer, R.D., Harmon, L.S., Kraynak, A.R., McKelvey, T.W., Hertzog, P.R., Keenan, K.P., DeLuca, J.G., Nichols, W.W. 1993. Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay. Mutation Research 291, 193-205.

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 339, 37-59.

Fujimiya, Y., Sussuki, Y., Oshiman, K.I., Kobori, H., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T., Katakura, R. 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murrill, mediated

via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunology Immunotherapy* 46,147-59.

Guterrez, Z.R., Mantovani, M.S., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Jordão, B.Q. 2004. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. *Toxicology in Vitro* 18, 301-309.

Hartmann, A., Speit, G. 1995. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutation Research* 346, 49-56.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.

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 tumor-bearing mice. *Anticancer Research* 17, 277-284.

Itoh, H., Ito, H., Amano, H., Noda, H. 1994. Inhibitory action of a (1(6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill ("himematsutake") on a Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Japan Journal Pharmacology* 66,265-271.

Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T. 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydrate Research 186, 267-273.

Knasmüller, 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.

Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C. 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. Toxicology. 198, 315-328.

Luiz, R.C, Jordão, B.Q., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S. 2003. 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. Mutation Research 528, 75-79.

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.O., Collins, A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutation Research 288, 7-63.

Menoli, R.C.A., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., Jordão, B.Q. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. Mutation Research 496, 5-13.

Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A. 1990. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agriculture Biology Science 54, 2889-2896.

Mizuno, T., Morimoto, M., Minato, K.I., Tsuchida, H. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. Bioscience Biotechnology Biochemical 62, 434-437.

Mlinaric, A., Kac, J., Fatur, T., Filipic, M. 2004. Anti-genotoxic activity of the mushroom *Lactarius vellereus* extracts in bacteria and in mammalian cells in vitro. Pharmazie 59, 217-221.

Natarajan, A.T., Darroudi, F. 1991. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. Mutagenesis 6,399-403.

Oliveira, J.M., Jordão, B.Q., Riberio, L.R., Eira, A.F., Mantovani, M.S. 2002. Anti-genotoxic effect of aqueous extarcts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. Food and Chemical Toxicology 40, 1775-1780.

Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J., Miyazaki, T. 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. Yakugaku-Zasshi 114, 342-350.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175, 184-191.

Speit, G., Hartmann, A. 1999. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S., (Ed.), Methods in Molecular Biology, DNA repair protocols: Eukaryotic Systems. Totowa: Humana Press, pp. 203-212.

Takeda, Y., Togashi, H., Shinzawa, H., Miyano, S., Ishii, R., Karasawa, T., Takeda, Y., Saito, T., Saito, K., Haga, H., Matsuo, T., Aoki, M., Mitsuhashi, H., Watanabe, H., Takahashi, T. 2000. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. Journal of Gastroenterology and Hepatology 15, 1079-1086.

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.

Wasser, S.P., Weiss, A.L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern Perspective. Critical Review Immunology 19, 65-96.

V- Conclusões Gerais

Com base nos resultados da avaliação do efeito do cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem.) sobre danos quimicamente induzidos ao DNA, em sistemas-teste *in vivo* (manuscrito 1) e *in vitro* (manuscrito 2), nas condições experimentais utilizadas, podemos concluir que:

- A solução aquosa do cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29) possui compostos que reduzem significativamente a frequência de células micronucleadas da medula óssea de ratos Wistar;
- A utilização de diferentes biomarcadores, em múltiplos órgãos de ratos Wistar, permitiu a identificação de um possível mecanismo de ação do cogumelo *A. brasiliensis*, ou seja a inibição da expansão clonal de células iniciadas (etapa de promoção da carcinogênese química);
- Extratos orgânicos do cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29) apresentam efeito antigenotóxico, *in vitro*, em células CHO-K1;
- Finalmente, os nossos resultados mostram que o cogumelo *A. brasiliensis* (AB 99/29) possui atividade antimutagênica, bem como atua inibindo a expansão clonal de células iniciadas no cólon de ratos Wistar machos; *in vitro*, este cogumelo apresenta efeito protetor diferente, em relação à utilização de extratos orgânicos, linhagens celulares e metabolismo celular.

