



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Atividade Antimutagênica e Citotóxica da  $\beta$ -glicana de *Agaricus  
brasiliensis* dependente da MAPK p38**

**Fabício Garmus Sousa**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jenifer Saffi**

**Porto Alegre**  
**Outubro de 2007**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Atividade Antimutagênica e Citotóxica da  $\beta$ -glicana de *Agaricus  
brasiliensis* dependente da MAPK p38**

**Fabício Garmus Sousa**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jenifer Saffi**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Porto Alegre  
Outubro de 2007**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiologia Molecular do Centro de Biotecnologia desta Universidade. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Laboratório de Genotoxicidade – Instituto Royal (GENOTOX-Royal), Centro de Biotecnologia – UFRGS.

*Nenhuma idéia é tão maluca que não mereça  
ser considerada com seriedade e firmeza.*

Winston Churchill

Dedico este trabalho a minha mãe,  
Catarina, minha namorada, Renata  
e meu amigo Jerso, com muito  
amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, Catarina, pela vida e pelo apoio incondicional. Mãe eu te amo!

A minha namorada, Renata, por estar sempre comigo, me apoiando, incentivando e prestando sua ajuda indispensável! Sem seu apoio eu não estaria aqui! Renata, você é muito importante para mim.

Ao meu amigo e ex-patrão Jerso, por sempre me incentivar a buscar meus ideais e sonhos, mesmo que isso significasse mais trabalho para ele! Jerso, sou grato por toda a ajuda que me deste, e pretendo tê-lo sempre como um grande amigo!

A minha orientadora Jenifer Saffi, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela confiança e por me manter no foco.

Ao prof.º Henriques, por estar sempre disponível para ajudar seus alunos e pelos conselhos.

A professora Ivana, por ensinar-me metodologias, ceder-me linhagens celulares e estar sempre disposta a ajudar.

Ao prof.º Guido Lenz, que me ensinou a buscar objetivamente o que existe de relevante e de novo na ciência.

Ao pesquisador Alexandre Escargueil por suas grandes contribuições na etapa final deste trabalho.

Aos meus amigos distantes, que mesmo assim me apoiaram, Fabio, Issao, Fabiano e Cíntia.

As minhas colegas diárias, Cassiana, Jacqueline e Lavínia, por tornarem o laboratório 219 minha segunda casa.

A Lauren, por dedicar muito do seu tempo trabalhando comigo e me ensinado técnicas importantes.

A todas as Guidetes, por contaminarem a sala de cultura com bom humor e amizade.

A todos os colegas do grupo, Jaqueline, Orlando, Juliana, Cláudio, Miriana, Renato, Dinara, Albanin, Iuri, Fernanda e Daniel, pelo convívio e por me ajudarem de diferentes maneiras.

Aos funcionários do Cbiot, Silvia e Luciano, por toda atenção e paciência, ao Milton e ao Paulo, por cuidarem tão bem do meu material de pesquisa, e ao Roberto Carlos, por cuidar da minha segurança nos incontáveis finais de semana.

A banca, Rafael Roesler, Jacqueline N. Picada e Mirian Salvadori, pela importante contribuição para o desfecho deste trabalho e a relatora/suplente Fabiana Horn pelas correções e observações.

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	16
1.1.1 $\beta$ -glicana.....	17
1.2 Antimutagênese.....	20
1.3. Mecanismos de paradas de ciclo celular.....	21
1.4 Indução de apoptose.....	24
1.5 Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. CAPITULO I.....	31
p38 MAPK-dependent antimutagenesis and cytotoxic of <i>Agaricus brasiliensis</i> $\beta$ -glucan	
4. DISCUSSÃO.....	50
5. CONCLUSÕES.....	56
6. PERSPECTIVAS.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. ANEXOS.....	66



8.1. Resultados Complementares.....	66
8.2. CURRICULUM VITÆ.....	70

## Lista de Abreviaturas

MAPK p38	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38
NFκB	Fator Nuclear κB
IL6	Interleucina 6
TLR1	Receptor Toll-like 1
TLR2	Receptor Toll-like 2
NK	Células Natural Killer
5-Fu	5-Fluorouracil
CR3	Receptor Complemento 3
DC	Dectin-1 ou β-glucan receptor
MMS	Metil-metanesulfonato
SRB	Sulforhodamine B
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide
H460	Linhagem celular humana provinda de adenocarcinoma de efusões pleurais
SW620	Linhagem celular humana provinda de adenocarcinoma de cólon
μM	Unidade de medida micromolar ( $10^{-6}$ M)
μg	Unidade de medida micrograma ( $10^{-6}$ gramas)
MN	Micronúcleos
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibidora de 50% da proliferação celular.
HRR	Reparo por recombinação homóloga
NHEJ	Reparo por recombinação não-homóloga

NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
BER	Reparo por excisão de bases
IARC	Internation Agency for Reseach on Cancer

## Lista de Figuras

Figura 1	Corpo de frutificação do <i>A. brasiliensis</i>	Pág. 17
Figura 2	Localização da $\beta$ -glicana e Estrutura da (1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicana	Pág. 18
Figura 3	Reações de resposta ao dano no DNA	Pág. 22
Figura 4	Componentes de paradas de ciclo celular em resposta a danos no DNA de humanos	Pág. 23
Figura 5	Características morfológicas de células em apoptose e em necrose	Pág. 25
Figura 6	Funções da MAPK p38 na regulação negativa da progressão do ciclo celular	Pág. 27
Figura 7	Funções da MAPK p38 na modulação da atividade de p53	Pág. 29

### Figuras apresentadas no Capítulo I

Figura 1	“Cytotoxicity of $\beta$ -glucan in H460 cell line with 24h of treatment”	Pág. 39
Figura 2	“Cytostatic effect of $\beta$ -glucan in H460 cell line employing the Flow Cytometry”	Pág. 40
Figura 3	“Apoptosis induction by $\beta$ -glucan in H460 cell line employing the Vybrant <sup>®</sup> assay”	Pág. 41
Figura 4	“Mutagenic effect of $\beta$ -glucan in H460 cell line employing Micronucleus assay”	Pág. 42
Figura 5	“Antimutagenesis effect of $\beta$ -glucan in H460 cell line employing Micronucleus assay”	Pág. 43
Figura 6	“Effect of $\beta$ -glucan on H460 cell cycle employing the Flow Cytometry”	Pág. 44
Figura 7	“Effect of antimutagenic treatments on H460 cell cycle employing the Flow Cytometry”	Pág. 45
Figura 8	Mecanismos a serem esclarecidos a respeito da antimutagênese da $\beta$ -glicana de <i>A. brasiliensis</i> .	Pág. 52
Figura 9	Modelo hipotético a respeito das vias de sinalização celular pelas quais a $\beta$ -glicana de <i>A. brasiliensis</i> induz a antimutagênese e a citotoxicidade	Pág. 54
Figura 10	Efeito da $\beta$ -glicana a população SubG1 de H460 pelo ensaio de citometria de fluxo	Pág. 66
Figura 11	Citotoxicidade da $\beta$ -glicana na linhagem celular H460 pelo ensaio SRB	Pág. 67
Figura 12	Citotoxicidade da $\beta$ -glicana na linhagem celular SW620 com 24 horas de tratamento	Pág. 67

- Figura 13 Efeito antimutagênico da  $\beta$ -glicana na linhagem celular SW620 empregando o teste de micronúcleos Pág. 68
- Figura 14 Efeito da  $\beta$ -glicana sobre o ciclo celular da linhagem SW620 pelo ensaio de citometria de fluxo Pág. 69
- Figura 15 Efeito da  $\beta$ -glicana sobre a população SubG1 da linhagem SW620 pelo ensaio de citometria de fluxo Pág. 69

## Resumo

Muitos estudos têm demonstrado que extratos de *Agaricus brasiliensis* têm atividade citotóxica e antimutagênica, estes efeitos foram relacionados à  $\beta$ -glicana, um polissacarídeo constituinte de parede celular presente em um grande número de organismos. No entanto, os mecanismos pelos quais este composto atua ainda não foram elucidados. O propósito deste trabalho foi identificar as possíveis vias de sinalização celular pelas quais a  $\beta$ -glicana induz os seus efeitos. Nós empregamos o inibidor da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (MAPK p38) para avaliar a possível participação desta proteína de sinalização celular nas atividades citotóxica e antimutagênica da  $\beta$ -glicana. Os efeitos da  $\beta$ -glicana sobre a citotoxicidade (Sulforhodamine B – SRB – e thiazolyl blue tetrazolium bromide – MTT), antimutagênese (Micronúcleos), ciclo celular (Citometria de fluxo) e indução de apoptose (Vybrant<sup>®</sup> Apoptosis Assay Kit) foram verificados na linhagem celular H460 (Adenocarcinoma de efusões pleurais). Citotoxicidade foi observada com altas concentrações do polissacarídeo, porém estas concentrações não induziram a apoptose pelo ensaio Vybrant<sup>®</sup>. No entanto, as mesmas concentrações levaram a um grande acúmulo de células em G2/M, indicando que a citotoxicidade da  $\beta$ -glicana resulta de sua capacidade de induzir a paradas de G2/M que podem inibir a proliferação celular. Por outro lado, concentrações não citotóxicas exibiram efeito antimutagênico, reduzindo o dano ao DNA induzido pelo MMS e permitindo a progressão do ciclo celular. Além disso, tanto a antimutagênese quanto a citotoxicidade da  $\beta$ -glicana foram inibidas pelo uso do inibidor da MAPK p38, demonstrando que estas duas diferentes atividades são dependentes de uma mesma via de sinalização celular.

## Abstract

Many studies have demonstrated that *Agaricus brasiliensis* has cytotoxic and antimutagenic activities; these effects were related to  $\beta$ -glucan, a polysaccharide constituent of the cell wall present in a large number of organisms. However, the exact mechanisms by which  $\beta$ -glucan acts are not yet elucidated. The purpose of this work was to better understand the possible signaling pathways by which  $\beta$ -glucan carries its effects. We employed a p38 Mitogen Activated Protein Kinase (p38 MAPK) inhibitor (SB 202190) to evaluate the possible involvement of this signaling protein in the antimutagenic and cytotoxic activities of  $\beta$ -glucan. Its effects on cytotoxicity (Sulforhodamine B – SRB – e thiazolyl blue tetrazolium bromide – MTT), antimutagenesis (Micronucleus assay), cell cycle progression (Flow Cytometry) and apoptosis induction (Vybrant<sup>®</sup> Apoptosis Assay Kit) were evaluated in H460 (human, pleural effusion, adenocarcinoma) cell line. Cytotoxicity was only observed at high concentrations of the polysaccharide. These concentrations did not induce a significant induction of apoptosis. However, these same concentrations trigger a high G2/M arrest, indicating that cytotoxicity of  $\beta$ -glucan in H460 results from its capacity to induce cell cycle arrest that could prevent cell proliferation. On the other hand, low concentrations showed antimutagenesis effect, reducing MMS-induced DNA damage and allowing cell cycle progression. Besides, both antimutagenesis and cytotoxicity were greatly abrogated by the use of p38MAPK inhibitor, showing that these different activities are dependent on the same signaling pathway.

# 1. Introdução

## 1.1. *Agaricus brasiliensis*

Atualmente, cogumelos e outros fungos utilizados pela medicina popular têm chamado a atenção de diversos setores da ciência por providenciarem compostos com notáveis propriedades terapêuticas. *Agaricus brasiliensis* S. Wasser (Agaricaceae, Agaricomycetideae), previamente conhecido como *Agaricus blazei* Murill, é um cogumelo comestível originário do Brasil, onde é conhecido como Cogumelo-do-Sol (GONZAGA *et al.*, 2005). Este basidiomiceto é frequentemente consumido como chá em diferentes partes do mundo no combate ao estresse, à osteoporose e à úlcera, além de melhorar a qualidade de vida de diabéticos (MIZUNO, 1995).

O corpo de frutificação do *A. brasiliensis* (fig. 1) contém 85 a 87% de água. Desidratado, este cogumelo é rico em proteínas (40 a 45%) e carboidratos (38 a 45%). Ele ainda contém 6 a 8% de fibras, 5 a 7% de resíduos totais, 3 a 4% de lipídeos e vitaminas como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, e niacina. Ele também contém uma quantidade relativamente grande de ergosterol (0,1 a 0,2%), o qual é convertido em vitamina D<sub>2</sub> após exposição à luz e ao cozimento. O principal componente mineral do cogumelo é o potássio (K), com 2,97% de sua massa seca (MIZUNO, 1995).



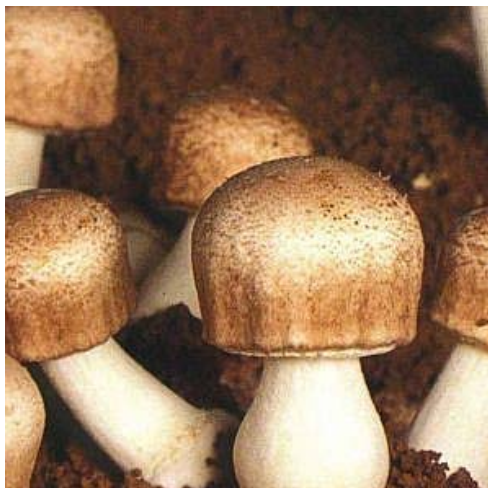


Figura 1. Corpo de frutificação do *A. brasiliensis*.  
([www.hyakka-saen.com/agarikusu/agarikusu.htm](http://www.hyakka-saen.com/agarikusu/agarikusu.htm))

Estudos com frações isoladas de *A. brasiliensis* demonstraram que as mesmas podem exibir atividade antimutagênica (OLIVEIRA *et al.*, 2002; LUIZ *et al.*, 2003), antitumoral (TAKEDA *et al.*, 2000) e imunoestimuladora (LEUNG *et al.*, 2006), tanto em estudos *in vitro*, quanto em estudos *in vivo*. KAWAGISHI (1989) foi o precursor no fracionamento dos compostos encontrados no corpo de frutificação do *A. brasiliensis*. O autor detectou polissacarídeos com atividade antitumoral, fração com maior atividade foi a FIII-2-b, composta de um complexo de proteína (43,3%) e hidratos de carbono (50,2%), os últimos representados principalmente pela (1→6)- $\beta$ -D-glicana.

#### 1.1.1. $\beta$ -glicanas

$\beta$ -glicanas são polissacarídeos de alto peso molecular encontrados em abundância em paredes celulares de diversos organismos, como bactérias, algas, fungos e plantas (PARK *et al.*, 2003). A localização deste polissacarídeo se faz na camada intermediária da parede celular (fig. 2a), adjacente à membrana plasmática, e sua função está relacionada a rigidez e a forma (SANDULA *et al.*, 1995). Segundo PARK *et al.* (2003), a  $\beta$ -glicana de *A.*

*brasiliensis* é formada por um esqueleto de (1→3)-β-D-glicose ao qual estão ligadas unidades do tipo (1→6)-β-D-glicose de tamanhos variados e que ocorrem em diferentes intervalos ao longo do esqueleto central (Fig. 2b)

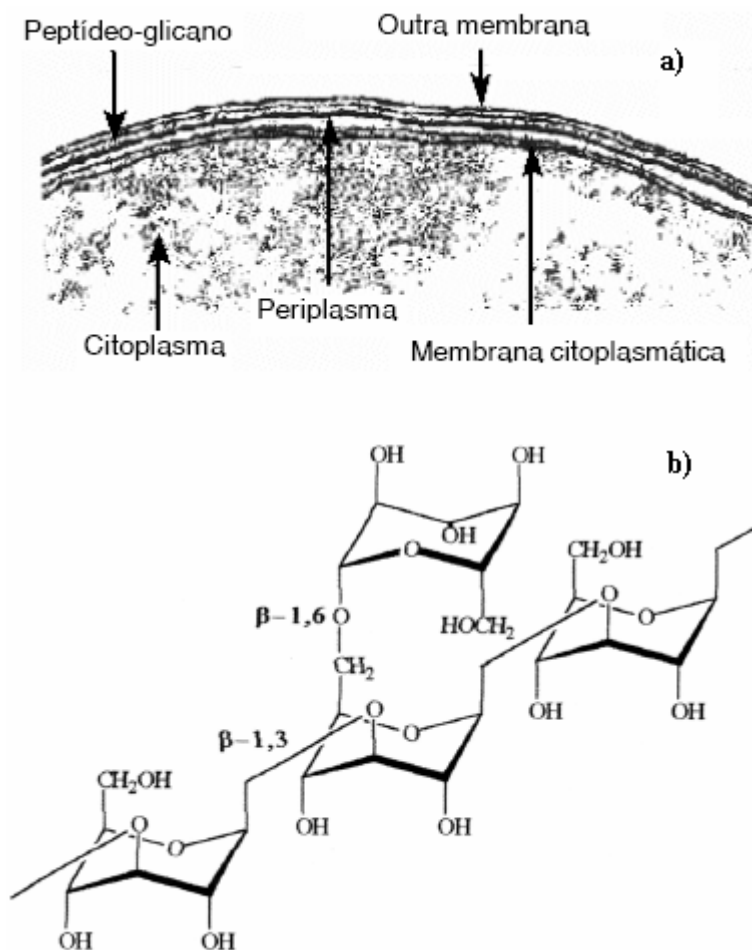


Figura 2. a) Localização da β-glicana e b) Estrutura da (1→3)-(1→6)-β-D-glicana (modificado de PARK, *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que grande parte das propriedades do *A. brasiliensis* derivam da β-glicana. A este polissacarídeo são atribuídas as seguintes atividades: antimutagênica, anti-oxidante (ANGELI, *et al.*, 2006); antígenotóxica (TOHAMY, *et al.*, 2003), antidiabética (KIM, *et al.*, 2005), imunoestimuladora (MUELLER, *et al.*, 2000), antitumoral e citotóxica (KOBAYASHI, *et al.*, 2005).

Interessantemente, estas distintas propriedades são observadas tanto em modelos *in vitro*, quanto em modelos *in vivo*. No entanto, poucos mecanismos são atribuídos a estes efeitos.

A atividade imunoestimuladora é a mais bem documentada no que se refere a mecanismos.  $\beta$ -glicanas de diversas fontes atuam como modificadores de resposta biológica (Revisado em LEUNG *et al.*, 2006), interagindo diretamente com receptores específicos de células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos, estimulando a ativação e ligação nuclear do Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e da interleucina 6 (IL6) (MUELLER, *et al.*, 2000). Além disso, esses polissacarídeos podem interagir com receptores Toll-like 1 e 2 (TLR1/2), receptor  $\beta$ -glicana/dectin-1 (DC) e Receptor Complemento 3 (CR3), levando à ativação de monócitos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas (LEUNG *et al.*, 2006).

Os mecanismos que explicam a atividade antitumoral e citotóxica da  $\beta$ -glicana ainda são pouco compreendidos, no entanto, recentemente um grupo de pesquisadores japoneses indicou um possível mecanismo de antitumorigênese e citotoxicidade da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis*. KOBAYASHI *et al.*, (2005) estudaram a atividade antitumoral e citotóxica do polissacarídeo, e demonstraram que a glicana é capaz de reduzir a progressão tumoral, por inibir a produção de uPA (fator metastático secretado por cânceres) e, desta forma, atuar nos passos iniciais do processo metastático. Além disso, os mesmos autores observaram em um sistema *in vitro* que a  $\beta$ -glicana exibe citotoxicidade dependente da MAPK p38, e sugeriram que a apoptose é o processo responsável pela citotoxicidade do composto.

A atividade antimutagênica é a propriedade cujos mecanismos são menos compreendidos. A  $\beta$ -glicana protege o DNA de diversos tipos de agentes indutores de danos, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANGELI *et al.*, 2006), cisplatina, ciclofosfamida, doxorubicina

(TOHAMY *et al.*, 2003), metil-metanosulfonato (OLIVEIRA *et al.*, 2006), entre outros. Esse polissacarídeo consegue proteger o DNA em sistemas *in vivo* (TOHAMY *et al.*, 2003) e *in vitro* (ANGELI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No entanto, apesar da pouca informação a respeito dos mecanismos que medeiam os efeitos da  $\beta$ -glicana, muitos pesquisadores já propõem esse composto como adjuvante terapêutico. TSUCHIYA, *et al.* (1991), propuseram a combinação do 5-Fluorouracil (5-Fu), um quimioterápico largamente utilizado, e da  $\beta$ -glicana. Os autores observaram que a administração do polissacarídeo resultou no aumento da população de células Natural Killer (NK) em camundongos, e concluíram que a glicana poderia ser empregada após a quimioterapia com 5-Fu com o objetivo de combater o tumor e ainda fortalecer o sistema imunológico.

## 1.2. Antimutagênese

A identificação de agentes inibidores de mutação torna-se útil na descoberta de compostos anticarcinogênicos (SIMIC *et al.*, 1998), considerando-se que os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados a carcinogênese. Assim, a possibilidade de controle da resposta celular contra os mutágenos, principalmente através da dieta, tem aberto uma nova fronteira para a prevenção e controle do câncer (TRICHOPOULOU *et al.*, 1995).

Segundo VON BORSTEL (1996), antimutagenicidade é a redução da taxa de mutações espontâneas e da frequência de mutações induzidas por agentes exógenos. Portanto, antimutagênico é todo agente que tem capacidade de reduzir a ocorrência de mutações. Neste contexto, diversos produtos químicos naturais têm sido investigados

quanto ao seu potencial antimutagênico e anticarcinogênico (KURODA *et al.*, 1992; DE FLORA *et al.*, 1992; LIVIERO & VON BORSTEL, 1996; MITSCHER *et al.*, 1996).

Os eventos de antimutagenicidade têm sido divididos em dois mecanismos principais: desmutagênico e bio-antimutagênico (GRUTER *et al.*, 1990; WATERS *et al.*, 1990). As substâncias bio-antimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA. Agem em nível celular aumentando a fidelidade na replicação, estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro (HARTMAN & SHANKEL, 1990; DE FLORA, 1998; SIMIC *et al.*, 1998). Substâncias desmutagênicas são capazes de inativar um agente mutagênico e caracterizam-se pela atuação do composto diretamente no agente mutagênico, ou em seus precursores, inativando-os química ou enzimaticamente (KADA & SHIMOI, 1987; FERGUSON, 1994).

O uso diário de produtos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos pode ser uma forma de prevenção do câncer e outras doenças genéticas, sendo dado o nome a este procedimento de quimioprevenção (GOMES *et al.*, 1996). Na mutagênese, o potencial quimiopreventivo de uma determinada substância é avaliado ao testar a mesma contra um agente mutagênico com atividade conhecida (ex: metil-metanosulfonato), permitindo a observação da redução ou não das lesões produzidas.

### 1.3. Mecanismos de paradas de ciclo celular

Danos ao DNA são eventos relativamente comuns na vida das células e podem levar a mutações, câncer e morte celular ou do organismo. Danos ao DNA induzem algumas respostas celulares que permitem a célula eliminar o dano ou ativar a morte

celular programada (apoptose), presumivelmente para eliminar as células com potenciais mutações catastróficas (Revisado em SANCAR *et al.*, 2004). O mesmo autor argumenta que essas reações de resposta ao dano incluem (fig.3): (a) remoção do dano no DNA e restauração da continuidade do duplex de DNA; (b) ativação de pontos de checagem (*Checkpoints*), os quais levam à parada da progressão do ciclo celular, permitindo o reparo e evitando a transmissão do dano as células-filhas; (c) resposta transcricional, que causa mudanças no perfil de transcrição que podem ser benéficas para a célula; e (d) apoptose, que elimina células desreguladas ou portadoras de extensos danos no DNA.

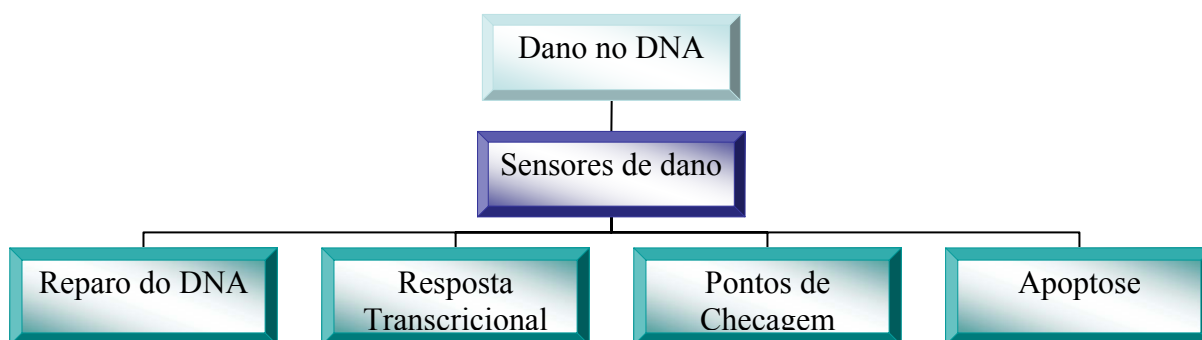


Figura 3. Reações de resposta ao dano no DNA. Adaptado de SANCAR *et al.*, 2004.

Pontos de checagem de danos no DNA são sistemas bioquímicos que atrasam ou param a progressão do ciclo celular em resposta ao dano no DNA (NYEBERG *et al.*, 2002). Todas as células eucarióticas possuem ciclo celular com quatro fases, G1, S, G2 e M. Segundo SANCAR *et al.*, (2004), em células com ciclo celular normal os pontos de transição de fases são rigorosamente controlados e existem evidências indicando que as mesmas proteínas envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular também estão envolvidas em processos de checagem dos danos ao DNA. O mesmo autor argumenta que os pontos de checagem não são unicamente sistemas ativados por danos no DNA, mas que são sistemas bioquímicos que operam sob condições normais de crescimento que são

amplificados, apresentando aumento na sua expressão, quando na presença de danos no DNA.

As paradas de ciclo celular, assim como outros sistemas de transdução de sinais, possuem quatro componentes: sensores, mediadores, transdutores de sinais e efetores (SANCAR *et al.*, 2004). A participação destes componentes está resumida na figura 4, em que os sensores reconhecem o dano no DNA, e com a ajuda dos mediadores, transduzem o sinal aos transdutores, que em resposta ativam ou inativam outras proteínas (efetores), as quais participam diretamente na inibição da transição G1/S, S ou G2/M.

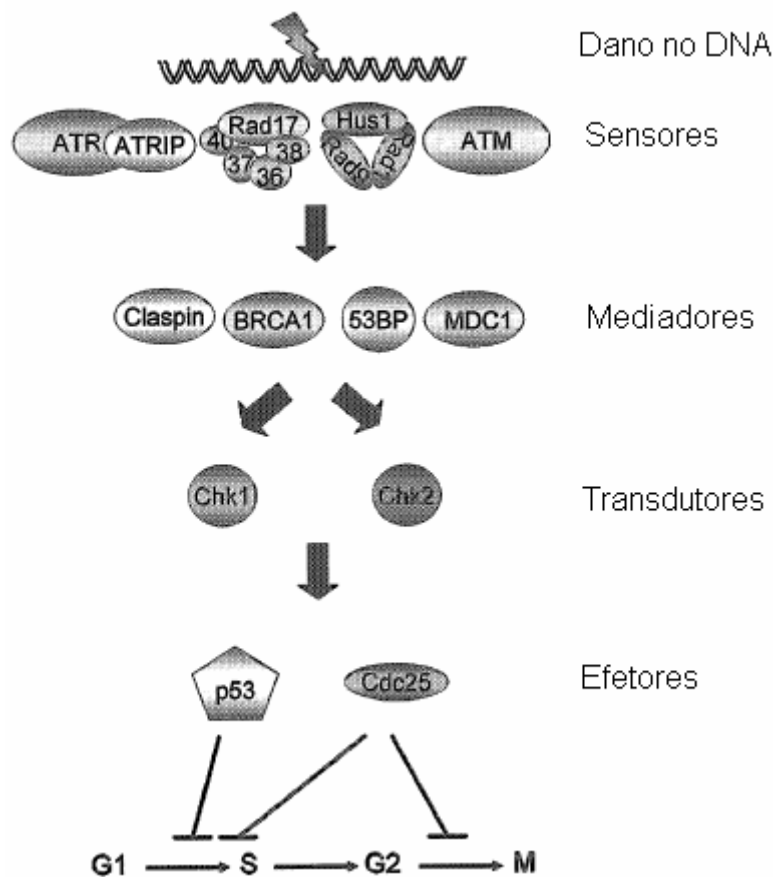


Figura 4. Componentes de paradas de ciclo celular em resposta a danos no DNA de humanos. Fonte: SANCAR *et al.*, 2004.

#### 1.4. Indução de apoptose

O desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares depende de interações entre as células que formam este organismo. Durante o desenvolvimento embrionário, muitas células são levadas à morte, contribuindo para a formação de órgãos e tecidos (MEIER *et al.*, 2000). Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada (apoptose) como resposta a estímulos intra ou extracelulares (HENGARTNER, 2000). Defeitos na indução de apoptose podem levar a um aumento na proliferação celular, observado em câncer, em doenças auto-imunes e infecções virais. Por outro lado, a apoptose em excesso é observada nas doenças neurodegenerativas ou isquemias e AIDS (FADEEL *et al.*, 1999).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes, tais como: Retração da célula; perda de aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas; condensação da cromatina; fragmentação internucleossômica do DNA; formação de pequenas bolhas envoltas pela membrana plasmática; fragmentação celular e formação de corpos celulares apoptóticos, sem liberação do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). Os corpos celulares serão, a seguir, fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (Fig. 5).



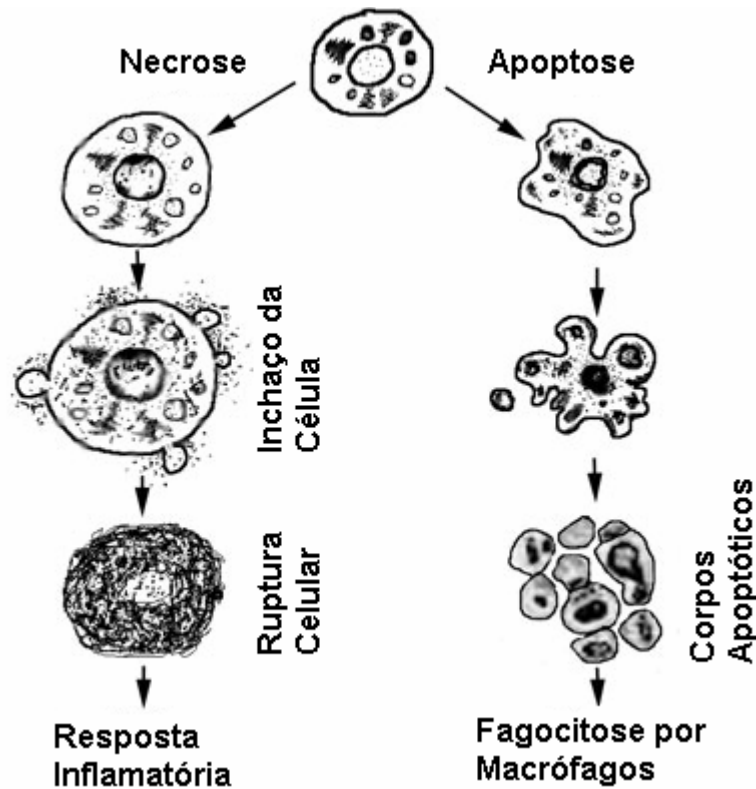


Figura 5. Características morfológicas de células em apoptose e em necrose (adaptado de <http://herkules oulu.fi/isbn9514266676/html/i267388.html>)

Diferente da apoptose, a necrose (Fig. 5) é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto irreversível que resulta na perda da integridade da membrana plasmática, inchaço da célula e conseqüente ruptura celular. Durante a necrose o conteúdo celular é liberado, causando dano nas células vizinhas e uma resposta inflamatória (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

A apoptose pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos que conduzem a subprogramas, que, quando desencadeados, induzem complexas interações entre as proteínas supressoras (Bcl-2, Bax-1, Bcl-x<sub>L</sub>) e promotoras da apoptose (Bax, Bcl-x<sub>S</sub>) (HENGARTNER, 2000; BORNER, 2003). Diversos fatores podem desencadear a apoptose, entre esses: interação de moléculas sinalizadoras de apoptose com receptores celulares de apoptose, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque

térmico, falta de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (HENGARTNER, 2000).

Segundo BERNSTEIN *et al.* (2002), quando o DNA é lesado, a maquinaria de reparo de DNA é acionada, e muitas vezes aciona uma cascata de sinalização celular que resulta em paradas de ciclo celular. No entanto, quando o dano é extenso demais para ser reparado, a expressão de proteínas supressoras de apoptose é diminuída e a expressão de proteínas promotoras de apoptose é aumentada, induzindo a apoptose, que pode ser de modo dependente da mitocôndria ou não. Quando dependente da mitocôndria (via intrínseca), proteínas pró-apoptóticas, como Bax, podem se transladar para a mitocôndria, formando canais na membrana lipídica e levando à liberação de citocromo *c* para o citoplasma (BERNSTEIN *et al.* 2002). O mesmo autor argumenta que o citocromo *c* inicia o processo de apoptose ativando caspases, que são proteínas especializadas em clivar outras proteínas essenciais para a sobrevivência das células. Quando o processo não é dependente de mitocôndria (via extrínseca), receptores de morte celular presentes na superfície das células ativam diretamente as caspases.

#### 1.6. Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38

O sistema das Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógenos (MAPK) tem um papel central em muitos processos de sinalização celular, e a MAP cinase p38 (MAPK p38) é um dos três principais componentes deste sistema (GOLDSMITH *et al.*, 2004; JOHNSON & LAPADAT, 2002). Algumas cascatas de sinalização celular culminam na ativação de cinases, tais como MKK3, MKK4 e MKK6, que por sua vez podem ativar a MAPK p38 pela fosforilação de uma região regulatória conservada (BRANCHO *et al.*, 2003;

GOLDSMITH *et al.*, 2004). Os sinais que ativam as cinases incluem diversos estímulos extracelulares, tais como estresse osmótico, citosinas próinflamatórias, luz ultravioleta, choque térmico e certos mitógenos (KYRIAKIS *et al.*, 2004). Em nível celular, a ativação da MAPK p38 resulta em múltiplas mudanças, incluindo regulação da transcrição, síntese protéica, expressão de receptores de superfície, regulação de proteínas de ciclo celular e apoptose (BULAVIN & FORNACE, 2004).

A MAPK p38 pode induzir a paradas de G1, S e G2/M através da regulação de diversas proteínas de ciclo celular (Fig. 6). A ativação da MAPK p38 pode induzir a paradas de G1 pela regulação negativa da atividade de Cdk4 (fig. 6) (BULAVIN & FORNACE, 2004). MAPK p38 também pode marcar a fosfatase Cdc25A para degradação, levando à atenuação da atividade de Cdk2 e conseqüentemente a paradas em S (fig. 6). BULAVIN & FORNACE (2004) relatam que a inibição das fosfatases Cdc25B e Cdc25c pela MAPK p38 pode resultar na subsequente inativação da cinase Cdc2, conduzindo a paradas de G2/M.

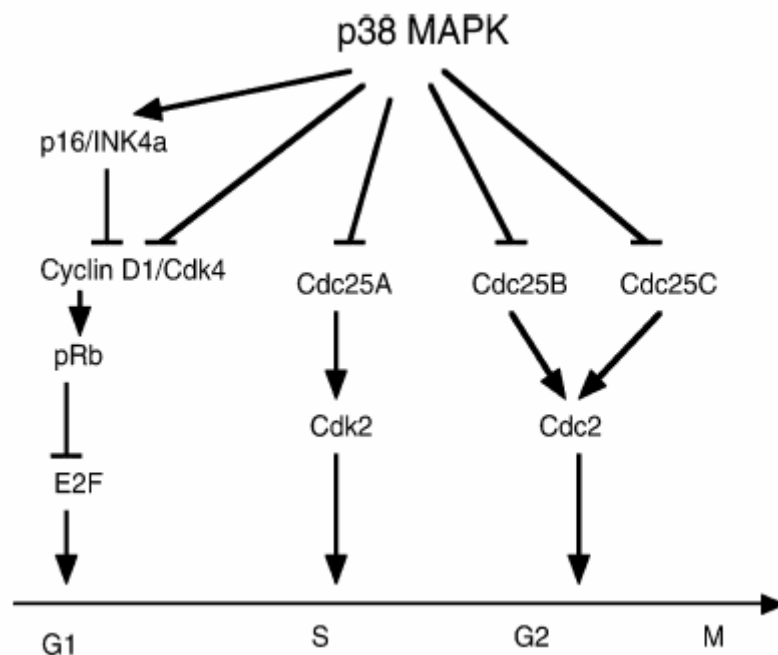


Figura 6. Funções da MAPK p38 na regulação negativa da progressão do ciclo celular (BULAVIN & FORNACE, 2004).

A proteína supressora tumoral p53 regula múltiplas funções celulares, incluindo paradas de ciclo celular (*Checkpoints*), apoptose e estabilidade genômica (VOGELSTEIN *et al.*, 2004). Muitos, se não todos, tipos de estresses genotóxicos e não-genotóxicos levam à estabilização de p53, impedindo sua degradação pela ubiquitina-ligase MDM2 e aumentando seus níveis celulares (VOUSDEN & LU, 2002). O aumento da estabilidade ou atividade transcricional de p53 depende criticamente de seu estado de fosforilação nos seus múltiplos resíduos de serina e treonina (APPELLA & ANDERSON, 2001).

A figura 7 apresenta as funções da MAPK p38 na modulação da atividade de p53. A MAPK p38 pode contribuir para ativação de p53 tanto diretamente, através da fosforilação das serinas 33 e/ou 46, quanto indiretamente, através da ativação dependente de estresse da CK2 (BULAVIN & FORNACE, 2004). A fosforilação da serina 33 aparentemente facilita a fosforilação da serina 37 (BULAVIN *et al.*, 1999). p53 pode induzir uma variedade de genes de controle de ciclo celular (fig. 7), os quais levam a paradas na transição G1/S (Cdk2) e controlam a progressão do ciclo celular através de paradas em G2/M (Cdc2) (BULAVIN & FORNACE, 2004).

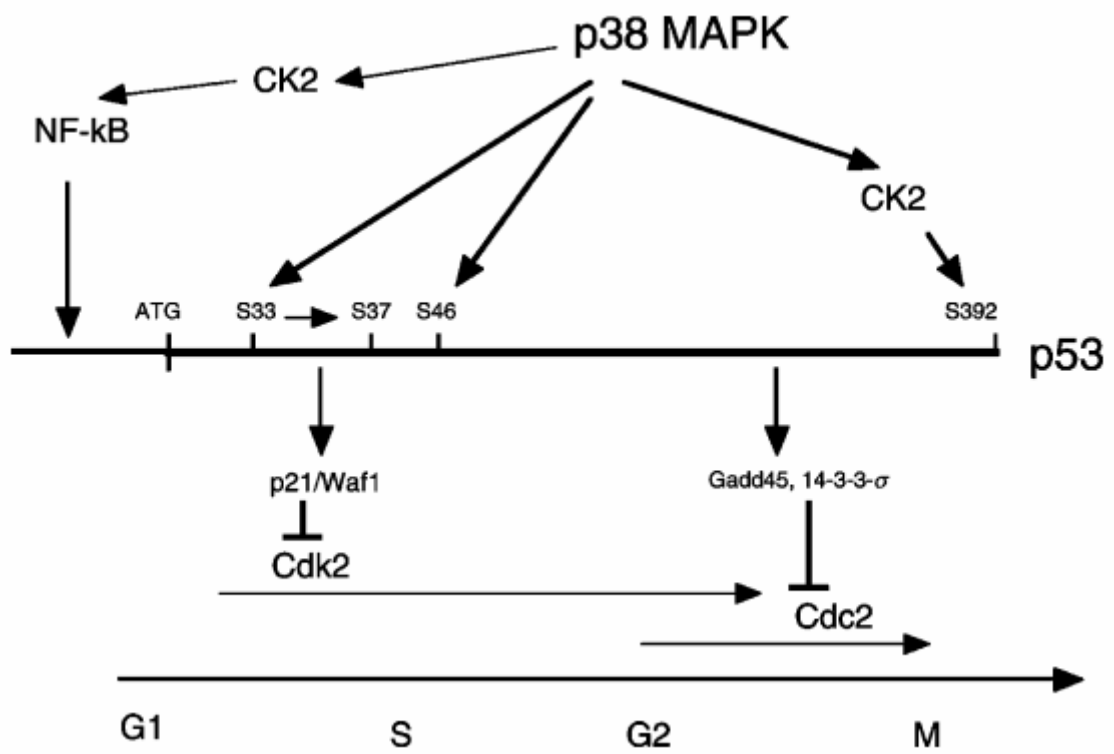


Figura 7. Funções da MAPK p38 na modulação da atividade de p53 (BULAVIN & FORNACE, 2004).

## 2. OBJETIVOS

À  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* são atribuídas muitas propriedades terapêuticas, tais como atividade imunoestimuladora, antitumoral e antimutagênica, no entanto, pouco é conhecido a respeito dos mecanismos que medeiam essas propriedades. A compreensão dos mecanismos pelos quais esse interessante polissacarídeo realiza suas atividades biológicas pode permitir a elaboração de terapias mais eficientes, de modo a explorar com efetividade todo o potencial terapêutico deste composto.

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o papel da via MAPK p38 na indução da antimutagênese e citotoxicidade da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* na linhagem celular H460 (Adenocarcinoma de Efusões Pleurais Humanas).

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da  $\beta$ -glicana sobre a progressão do ciclo celular e apoptose, assim como a possível relação entre a citotoxicidade e antimutagênese.
- Verificar o envolvimento da MAPK p38 no mecanismo de antimutagênese e citotoxicidade da  $\beta$ -glicana.

### **3. CAPÍTULO I**

**p38 MAPK-dependent antimutagenesis and cytotoxic of  
*Agaricus brasiliensis*  $\beta$ -glucan**

Manuscrito a ser submetido

## **p38 MAPK-dependent antimutagenesis and cytotoxic of *Agaricus brasiliensis* $\beta$ -glucan**

Sousa, F.G.<sup>1</sup>; Matuo, R.<sup>1</sup>; Grivicich, I.<sup>2</sup>; Escargueil, A.E.<sup>3,4</sup>; Ribeiro, L.R.<sup>5</sup>; Mantovani, M.S.<sup>6</sup>; Henriques, J.A.P.<sup>1,3,7</sup>; Saffi, J.<sup>1,7</sup>

1. Department of Biophysics and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Porto Alegre – RS. Brazil.
2. Laboratory of cellular stress markers; Universidade Luterana do Brasil – Ulbra. Canoas – RS. Brazil.
3. Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul – Caxias do Sul, RS, Brazil.
4. INSERM U673 & Université Pierre et Marie Curie, France.
5. Department of Cellular Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.
6. Department of General Bionlogy, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil.
7. Laboratory of Toxicological Genetics, Universidade Luterana Brasileira – Ulbra. Canoas – RS. Brazil.

### **Abstract**

Many studies have demonstrated that *Agaricus brasiliensis* has cytotoxic and antimutagenic activities; these effects were related to  $\beta$ -glucan, a polysaccharide constituent of the cell wall present in a large number of organisms. However, the exact mechanisms by which  $\beta$ -glucan acts are not yet elucidated. The purpose of this work was to better understand the possible signaling pathways by which  $\beta$ -glucan carries its effects. We employed a p38 MAP Kinase inhibitor (SB 202190) to evaluate the possible involvement of this signaling protein in the antimutagenic and cytotoxic activities of  $\beta$ -glucan. Its effects on cytotoxicity (SRB/MTT), antimutagenesis (Micronucleus assay), cell cycle progression (Flow Cytometry) and apoptosis induction (Vybrant<sup>®</sup> Apoptosis Assay Kit) were evaluated in H460 (human, pleural effusion, adenocarcinoma) cell line. Cytotoxicity was only observed at high concentrations of the polysaccharide. These concentrations did not induce a significant induction of apoptosis. However, these same



concentrations trigger a high G2/M arrest, indicating that cytotoxicity of  $\beta$ -glucan in H460 results from its capacity to induce cell cycle arrest that could prevent cell proliferation. On the other hand, low concentrations showed antimutagenesis effect, reducing MMS-induced DNA damage and allowing cell cycle progression. Besides, both antimutagenesis and cytotoxicity were greatly abrogated by the use of p38MAPK inhibitor, showing that these different activities are dependent on the same signaling pathway.

*Key-words:* *Agaricus brasiliensis*,  $\beta$ -glucan, p38 MAPK, Antimutagenesis, Cytotoxicity.

## 1. Introduction

*Agaricus brasiliensis* (previously reported as *Agaricus blazei* Murill, Agaricales, Agaricaceae) is an edible mushroom that is used by alternative medicine to stimulate the immune system, prevent diabetes, reduce cholesterol, and for treatment of circulatory and digestive troubles. Many studies have demonstrated antitumor (Mizuno, 1995), antimutagenic (Delmanto *et al.*, 2001; Menoli *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002), immunoactive (Itoh *et al.*, 1994) and antioxidant (Oliveira *et al.*, 2007) properties of *A. brasiliensis*.

These biological activities were related to  $\beta$ -glucan ( $\beta$ g), an abundant cell wall polysaccharide that is found in many organisms. In *A. brasiliensis*, the predominant  $\beta$ -glucan is  $\beta$ -(1-3)-(1-6)-D-glucan (Kawagishi *et al.*, 1989).  $\beta$ -glucans, isolated from other organisms, show structural differences but similar biological properties (Leung *et al.*, 2006). These compounds were reported to exert antitumor and antimutagenic activities (Larosche, 2007), both *in vitro* and *in vivo*. However, the exact mechanisms by which  $\beta$ -glucan acts are not yet fully elucidated.

Many different approaches have been used to try to understand its antimutagenic effects. Oliveira *et al.* (2006) evaluated the antimutagenic activity of  $\beta$ -glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae* by micronucleus and comet assays and concluded that  $\beta$ -glucan had both desmutagenic and bioantimutagenic effects. Angeli *et al.* (2006) showed that *A. brasiliensis*  $\beta$ -glucan is able to protect human peripheral lymphocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage (comet assay); however its protection could not relate to direct binding effects of  $\beta$ -glucan and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Kobayashi *et al.* (2005) studied the antitumor and cytotoxic activities of *A. brasiliensis*  $\beta$ -glucan. They showed that this compound displays antitumor activity by both reducing cell proliferation and inducing apoptosis. It inhibits uPA (a metastasis factor), thus acting in initial steps of the metastatic processes. They also demonstrated that  $\beta$ -glucan cytotoxicity relies on the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and suggested that induction of apoptosis is the process responsible for  $\beta$ -glucan cytotoxicity.

Understanding the mechanisms involved in cytotoxicity and antimutagenesis of  $\beta$ -glucan could help in the development of new therapies that explore the interesting properties of this compound. In our work we wish to better understand the role of p38

MAPK in both cytotoxicity and antimutagenesis induced by *A. brasiliensis*  $\beta$ -glucan, as well as exploring the interference of this polysaccharide in cell cycle progression and apoptosis induction.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Methyl Methane-sulfonate (MMS), trichloroacetic acid (TCA), trizma base, sulforhodamine B (SRB) and SB 202190 (p38 MAPK inhibitor) come from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal calf serum, trypsin-EDTA and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Giemsa stain was bought from Merck (Darmstadt, Germany) while Vybrant<sup>®</sup> Apoptosis Assay Kit was purchased from Invitrogen (Paisley, UK).

### 2.2. $\beta$ -glucan extraction

*A. brasiliensis* was provided from Universidade Estadual Paulista (UNESP).  $\beta$ -glucan was extracted and purified as previously described (Gonzaga et al., 2005). The dried mushrooms were dissolved in distilled water at 5% (w/w) and 100 °C for 5 h. The suspensions were centrifuged and clear colorless orange extracts were obtained. The filtrates were neutralized to pH 7.0 by addition of diluted NaOH solution. To the filtrate was added NaCl—1.0% w/v to induce subsequent precipitation of the polysaccharides in ethanol. It was added ethanol solution of the extract, 5:1, to obtain the precipitates, which were isolated from the ethanolic medium by centrifugation, washed with acetone and dried. Hydrogen peroxide (30%) was used as a 1:1 ethanol/peroxide mixture for approximately 15 h at room temperature for the clarification of the extracted material. Due to its partial solubilization the materials were submitted to a second extraction using ethanol/volume of the extract (4:1). All the precipitates were isolated by centrifugation, washed with ethanol then acetone, and dried in a sand bath at 40 °C. To purify the samples from possible insoluble substances, the isolated materials were dissolved in distilled water with stirring at 40 °C for 48 h. After this procedure the suspensions were centrifuged and the soluble phase was removed and submitted to lyophilization.

### 2.3. Cell Culture and p38 MAPK inhibition

The H460 human pleural effusion adenocarcinoma cell line was obtained from American Culture Collection (Rockville; MD, USA). The cells were maintained in DMEM medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum at a temperature of 37 °C and in a

humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. To evaluate p38 MAPK involvement in cytotoxicity and antimutagenesis, 10 µM of SB 202190, a p38 MAPK inhibitor, was added 30 minutes prior to treatments.

#### *2.4. Cytotoxicity Studies*

Cells were seeded into 96-well microplates at  $2.5 \times 10^4$  cells per well in 100 µL. After 24 h, cultures were treated with 100 µL of β-glucan in different concentrations. Cytotoxicity was assessed by means of the Sulforhodamine B – SRB – (Skehan *et al.*, 1990) and thiazolyl blue tetrazolium bromide – MTT – (Mosmann, 1983) assays. Absorbance was read at a wavelength of 540 nm and semi logarithmically plotted against drug concentrations.

#### *2.5. Mutagenesis and Antimutagenesis Evaluation*

Mutagenesis and antimutagenesis were evaluated by micronucleus assay using non-cytotoxic concentrations as previously determined. Cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were seeded into 6-well plates and incubated for 24 h. Treatments were performed in culture medium without serum for 3 h. Cells were then washed and incubated for further 21 h in drug-free medium to allow micronucleus generation. Antimutagenic activity of β-glucan was assessed by its capacity to counterbalance the mutagenic activity of MMS, used at 200 µM. Procedures for harvesting and fixing cells were done according to Matsushima *et al* (1999). A total of 6000 cells were analyzed per treatment for the presence of micronucleus in optical microscopy with 1000x of magnification.

#### *2.6. Cell Cycle Analysis*

Cell cycle was assessed by flow cytometry. After drug treatments, cells were harvested and washed two times in ice-cold PBS. Then, cells were collected and fixed in ethanol absolute overnight at 4 °C. The cell pellet was washed with ice-cold PBS, and resuspended in 0.5 mL PBS. Fluorochrome solution - 0.5 mL - (RNase A 250µg/mL, 100 µg/mL propidium iodide, 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100) were added to the cells and samples were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Cells were kept at 4 °C until analysis. Cells (15.000) were assessed using the FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

### *2.7. Apoptosis Induction*

Apoptosis induction was evaluated by the Vybrant® Apoptosis Assay Kit as following the manufacturer's protocol. Cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were seeded into 6-well plates, previous prepared with one sterile coverslips per well, and after 24 h of incubation treatments were performed. After treatments, cells were washed with cold PBS, coverslips were carefully removed and incubed in the dark with 15 ul of Vybrant-Propidium iodide solution for 15 minutes at room temperature. Apoptosis visualization was performed in Axiovert 200 microscopy (Carl Zeiss, Göttingen, DE) with 100x of magnification using a rhodamin filter and pictures were collected with Axiovision Rel. 4.5 program.

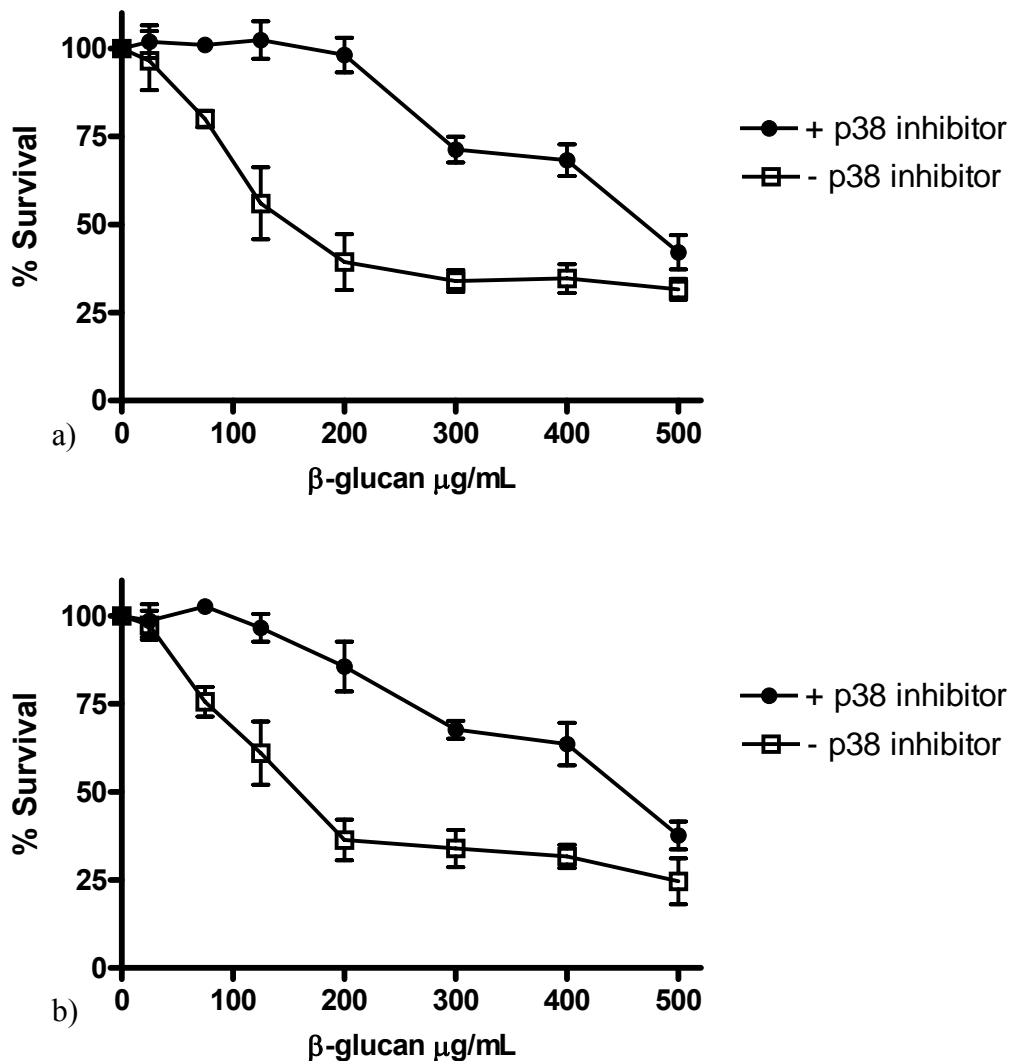
### *2.8. Statistical Analysis*

Results of micronucleus were evaluated by the statistical test analysis of variance – one way ANOVA, and Bonferroni's post-hoc test was used to compare treatment groups.

### 3. Results

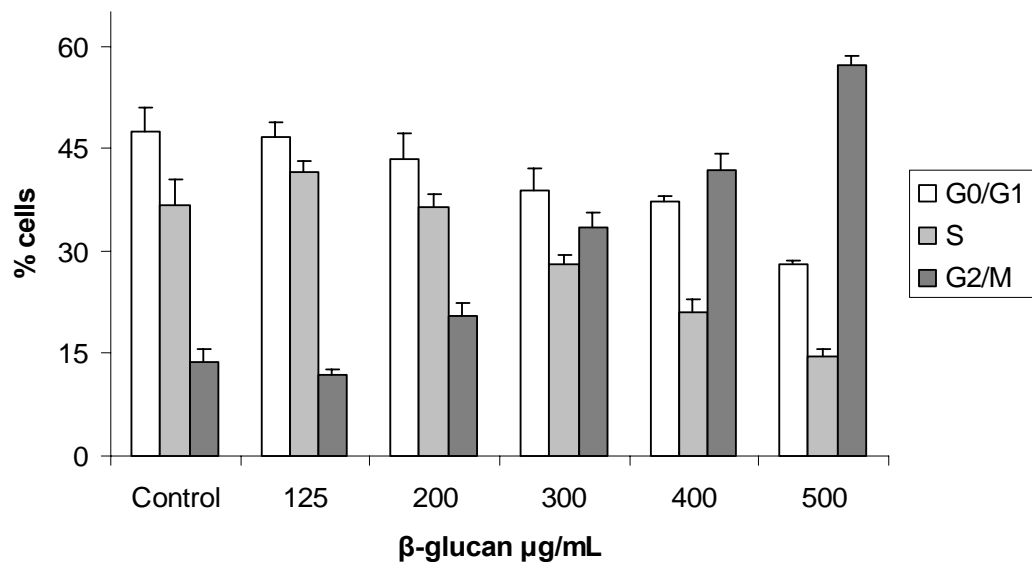
#### 3.1. Cytotoxic activity of $\beta$ -glucan

$\beta$ -glucan induced cytotoxicity was assessed in H460 cell line by SRB (fig.1a) and MTT (fig.1b) assays. In both cases, the estimated  $IC_{50}$  was approximately 180  $\mu$ g/mL. However, when 10  $\mu$ M of SB 202190, a p38 MAPK inhibitor, was added 30 minutes prior to  $\beta$ -glucan treatments, the cytotoxic activity of the polysaccharide was reduced, indicating that p38 MAPK is a key determinant of  $\beta$ -glucan induced cytotoxicity, in agreement with previous report (Kobayashi *et al.*, 2005).



**Figure 1:** Cytotoxicity of  $\beta$ -glucan in H460 cell line with 24 h of treatment. The percentage of cellular growth inhibition induced by  $\beta$ -glucan without p38 MAPK inhibition ( $\square$ ) and with p38 inhibitor ( $\bullet$ ). a) SRB assay and b) MTT assay.

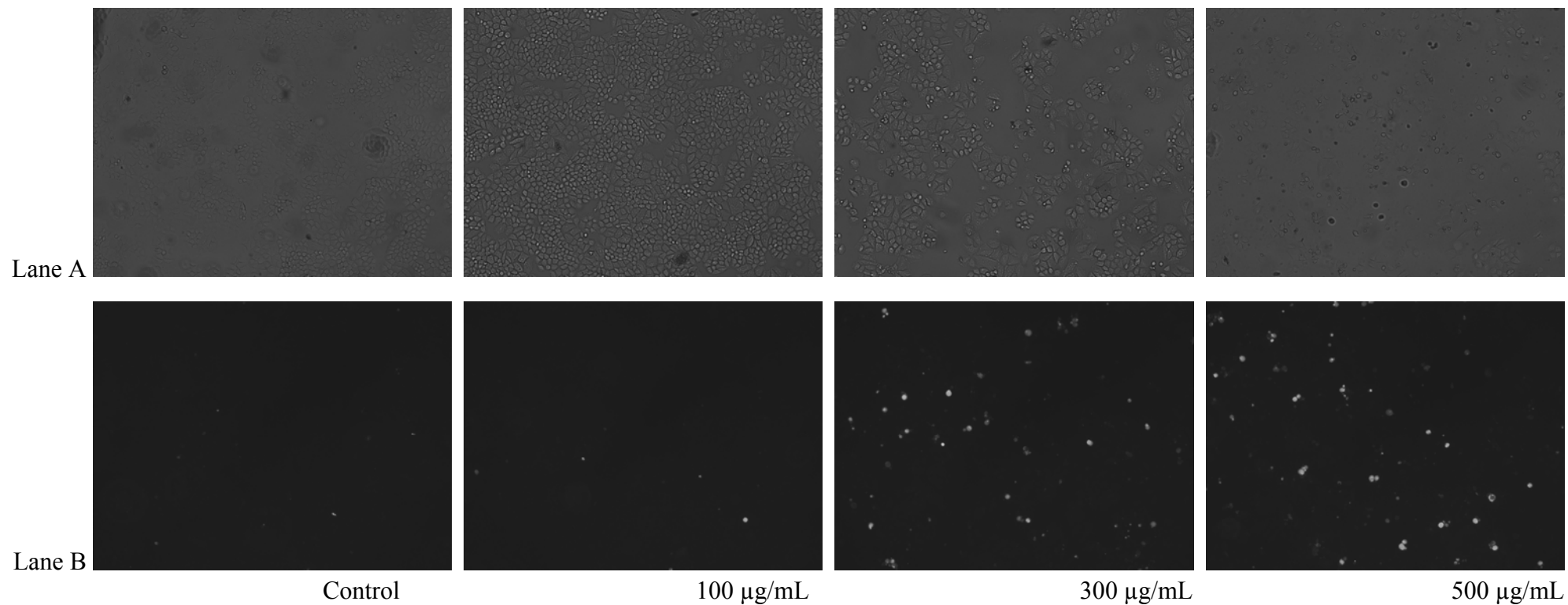
To better understand the cytotoxicity of this compound, we have analyzed the  $\beta$ -glucan interference in the cell cycle. Results from flow cytometry, shown in fig. 2, demonstrate that  $\beta$ -glucan induces a large G2/M arrest in concentrations higher than  $IC_{50}$ . However, a small increase of subG1 population was observed (data not shown<sup>1</sup>), indicating the presence of a small apoptotic cell population. To make sure that apoptosis was not the main process involved in  $\beta$ -glucan cytotoxicity, we performed Vybrant<sup>®</sup> assay (fig.3), in which  $\beta$ -glucan induced a slight increase of apoptotic population (fluorescent fields). However, this increase was not consistent with the large decrease in cell quantity observed in non-fluorescent fields. The decrease in cell population could be a consequence of the  $\beta$ -glucan cytostatic effect, which inhibits normal cell proliferation (Sancar *et al.*, 2004).



**Figure 2:** Cytostatic effect of  $\beta$ -glucan in H460 cell line employing the Flow Cytometry. Cells (15.000) were scored after 24 h of treatment.

<sup>1</sup> Resultados apresentados na figura 10 – Anexos.

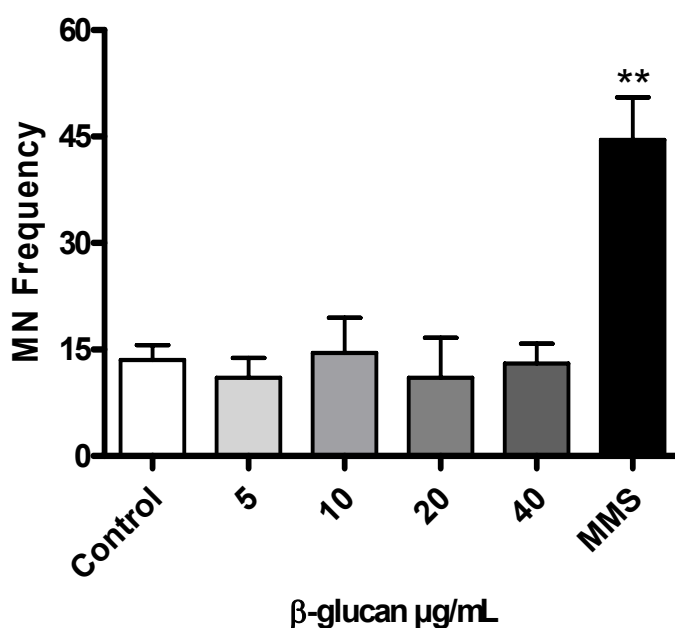




**Figure 3:** Apoptosis induction by  $\beta$ -glucan in H460 cell line employing the Vybrant<sup>®</sup> assay. Cells were treated for 24 h with specified concentrations of  $\beta$ -glucan. Proportion of apoptotic cells could be achieved by comparison of the fluorescent fields, lane B (apoptotic cells) and non-fluorescent fields, lane A (total population).

### 3.2. Assessment of the mutagenic activity of $\beta$ -glucan

Cytotoxicity of mutagenesis and antimutagenesis treatments was previously evaluated by the SRB test. The cytotoxicity of all treatments not exceeds 10% (data not shown)<sup>2</sup>. Mutagenesis was accessed by the micronucleus assay (fig.4) and the results showed that  $\beta$ -glucan did not induce mutagenesis in the H460 cell line, which are in agreement with Tohamy *et al.* (2003), Oliveira *et al.* (2006) and Angeli *et al.* (2006).

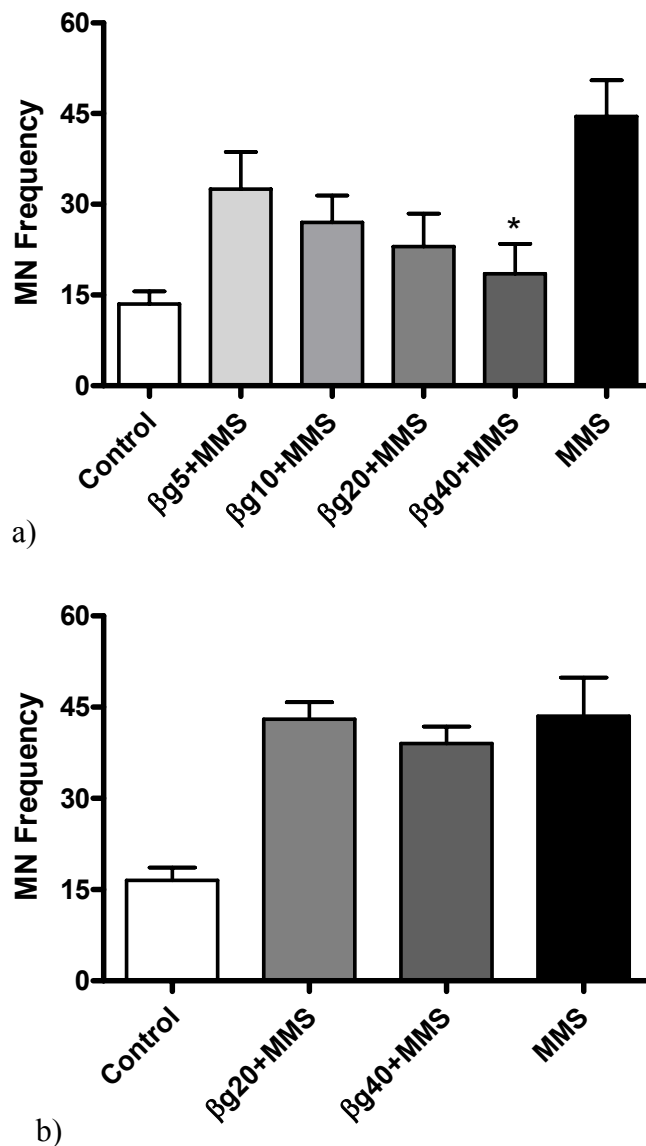


**Figure 4:** Mutagenic effect of  $\beta$ -glucan in H460 cell line employing Micronucleus assay. Assays were performed with 3 h of treatment followed by 21 h of recovery time. MMS (200  $\mu\text{M}$ ) was employed as a positive control. Statistical significance was accessed by ANOVA-one way and Bonferroni's post test. \*\*  $p < 0.01$ .

### 3.3. Antimutagenic activity of $\beta$ -glucan

The antimutagenesis results are shown in fig. 5a and demonstrate that simultaneous incubation of  $\beta$ -glucan with MMS led to a significant reduction in micronucleus frequency induced by MMS alone. These results are in agreement with previous reports (Tohamy *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2006; Angeli *et al.* 2006). However, when p38 inhibitor was added before treatments, the antimutagenic effect of  $\beta$ -glucan was abolished (fig. 5b), indicating that the antimutagenic activity of  $\beta$ -glucan is dependent on the p38 MAPK pathway.

<sup>2</sup> Resultados apresentados na figura 11 – Anexos.

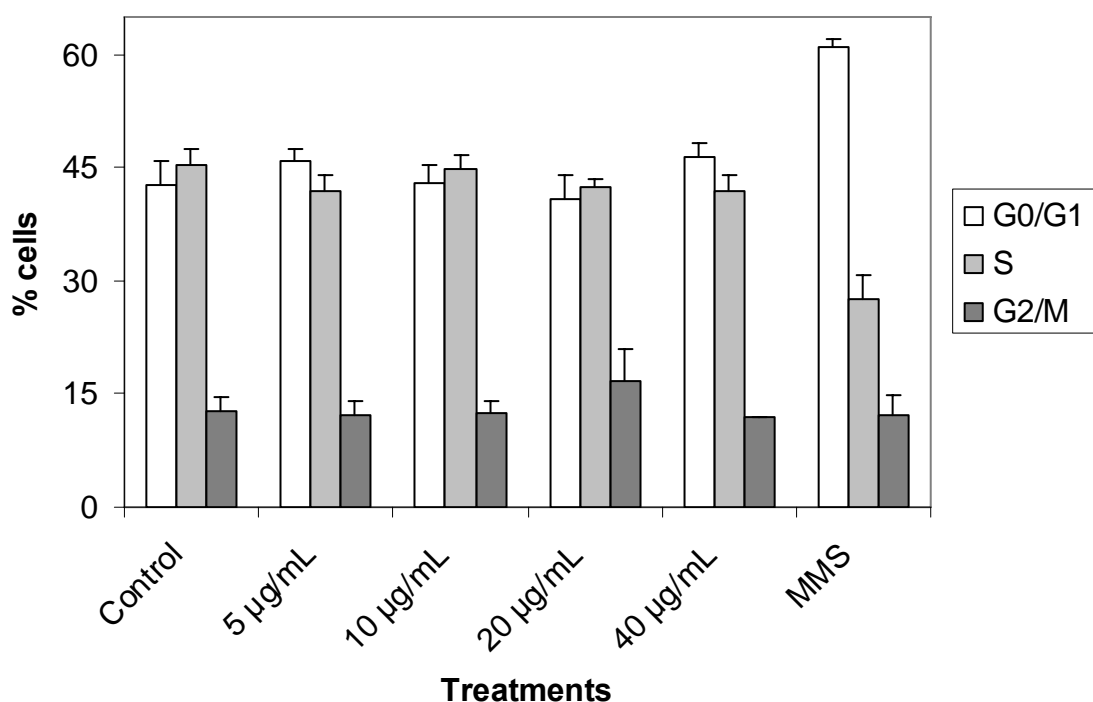


**Figure 5:** Antimutagenesis effect of  $\beta$ -glucan in H460 cell line employing Micronucleus assay. Assays were performed with 3 h of treatment followed by 21 h of recovery time.  $\beta$ -glucan in specified concentrations and 200  $\mu$ M of MMS were administered simultaneously. a) Without SB 202190, and b) With SB 202190 (10  $\mu$ M). Statistical significance was accessed by ANOVA-one way and Bonferroni's post test. \*  $p < 0.05$  ( $\beta$ -glucan vs MMS).

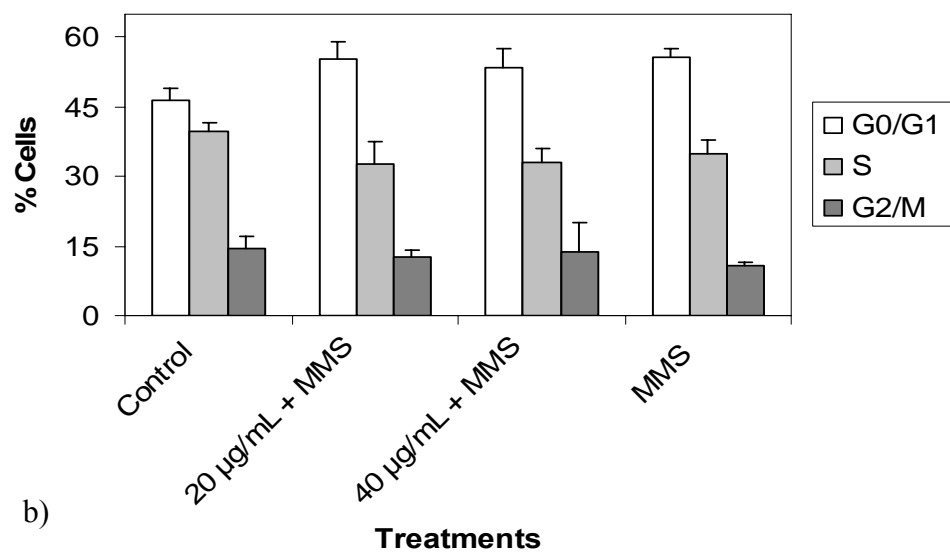
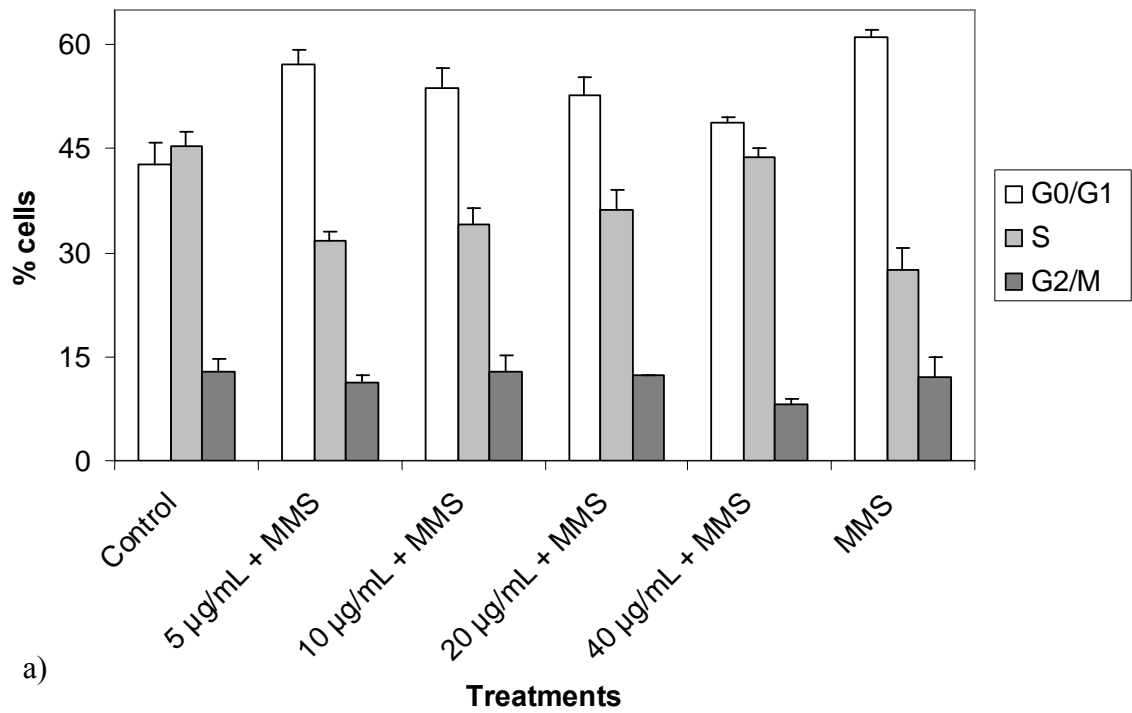
### 3.4. The antimutagenic activity of $\beta$ -glucan is linked to the cell cycle progression

In order to understand the effects of  $\beta$ -glucan on the cell cycle, treatments with  $\beta$ -glucan alone were performed (fig. 6). Results from flow cytometry demonstrated that  $\beta$ -glucan in specified concentrations did not interfere in the cell cycle by itself, and that MMS at 200  $\mu$ M is able to induce a large G0/G1 arrest. However, combined treatments of

$\beta$ -glucan antimutagenic concentrations and MMS (fig. 7a) showed that  $\beta$ -glucan is able to stimulate a reduction of cells arrested in G0/G1 induced by MMS. But, when the p38 MAPK was employed this effect was abolished (fig. 7b), suggesting that the cytostatic effect responsible for the antimutagenic activity of  $\beta$ -glucan was dependent on p38 MAPK. These data suggest that the polysaccharide can stimulate or facilitate DNA repair by modulating the cell cycle (Sancar *et al.*, 2004).



**Figure 6:** Effect of  $\beta$ -glucan on the H460 cell cycle employing the Flow Cytometry. Cells (15.000) were scored after 3 h of treatment and 21 h of recovery time.  $\beta$ -glucan was employed in specified concentrations and MMS at 200  $\mu$ M.



**Figure 7:** Effect of antimutagenic treatments on H460 cell cycle employing the Flow Cytometry. Cells (15.000) were scored after 3h of treatment and 21h of recovery time.  $\beta$ -glucan in specified concentrations and 200  $\mu$ M of MMS were simultaneous administered. a) Without SB 202190, and b) With SB 202190.

#### 4. Discussion

The involvement of p38 MAPK in cytotoxicity of  $\beta$ -glucan was previously reported by Kobayashi *et al.* (2005). These authors observed that  $\beta$ -glucan treatments induced to phosphorylation of the p38 MAPK in human ovarian cancer cells (HRA). Besides they showed that the use of SB 203580 (a p38 MAPK inhibitor) before treatments with  $\beta$ -glucan inhibited its cytotoxic effect and indicated that cytotoxic effect of the  $\beta$ -glucan result from its ability to induce to apoptosis. Our results also indicated that cytotoxicity of  $\beta$ -glucan is dependent of p38 MAPK (fig. 1). However, in H460 cell line the cytotoxicity effect of  $\beta$ -glucan results mainly from its cytostatic effect (fig. 2), in which cytotoxic concentrations of  $\beta$ -glucan induced to G2/M arrest. These results indicated that mechanism of cytotoxicity of the  $\beta$ -glucan could change between tumor cell lines. However, p38 MAPK seems to be important to both apoptosis and cytostatic effects. p38 MAPK could induce directly or indirectly apoptosis or cell cycle arrests (Bulavin & Fornace, 2004).

Antimutagenic effect of  $\beta$ -glucan was achieved with non-cytotoxic concentrations (fig. 5a). However, when p38 MAPK inhibitor was added before treatments the antimutagenic effect of  $\beta$ -glucan was abolished (fig. 5b), indicating that antimutagenic activity, as the cytotoxic effect, was dependent on the p38 MAPK. These results could explain the report of Angeli *et al.* (2006), in which antimutagenesis of  $\beta$ -glucan could not be related to interaction between polysaccharide and  $H_2O_2$ . Its possible that  $\beta$ -glucan could not interact directly with DNA damager, however  $\beta$ -glucan could protect DNA from damage by stimulation of p38 MAPK pathway. The same could be true in results of Oliveira *et al.* (2006), in which  $\beta$ -glucan showed bioantimutagen activity.

With the aim of explore the possible mechanism by which  $\beta$ -glucan induce its antimutagenic activity we analyze the effect of antimutagenic treatments on cell cycle. Figure 6 demonstrated that antimutagenic concentrations of the  $\beta$ -glucan did not change cell cycle by itself. However in presence of G0/G1 arrest and DNA damage induced by MMS  $\beta$ -glucan reduced G0/G1 arrests and increase S population (fig. 7a). These results suggest that  $\beta$ -glucan could reduce DNA damage or improve its repair, which results in cell cycle progression (fig. 7a). However, when p38 MAPK inhibitor was added before treatments these effects was abolished (fig. 7b).

It is possible that the antimutagenic concentrations of  $\beta$ -glucan stimulate, *via* p38 MAPK, the cell cycle arrest machinery, but its stimulation does not lead to the arrest. However, in the presence of DNA damage these stimulated cells could be able to arrest faster and efficiently in order to improve DNA repair and progress in the cell cycle (fig. 7a). However, the superstimulation induced by high concentrations of  $\beta$ -glucan could result in cell cycle arrests, as the observed in figure 2. These arrests could inhibit the cell proliferation and was interpreted as cytotoxic effect (fig. 1).

Results presented here could have a important clinic relevance. Since functionality of p38 MAPK is important to the antimutagenic activity of  $\beta$ -glucan and p38 MAPK is a tumor-suppressor frequently mutated in many types of cancers (Bulavin & Fornace, 2004),  $\beta$ -glucan could be used as an adjuvant in DNA damage-based chemotherapy (Bernstein *et al.*, 2002). In this therapeutic approach DNA from normal p38 MAPK cells could be protected by  $\beta$ -glucan, while DNA from p38 MAPK-mutated cancer cells could not be protected. This therapeutic approach could improve life quality of patients and enhance chemotherapy effectiveness.

In our work we demonstrated that antimutagenic and cytotoxic effects of *A. brasiliensis*  $\beta$ -glucan were dependent on p38 MAPK. The DNA protection conferred by the  $\beta$ -glucan result from it ability of stimulate cell cycle progression in presence of G0/G1 arrest and DNA damage induced by MMS. While cytotoxic effect result from G2/M arrest induced by high concentrations of  $\beta$ -glucan. Our goal is then now to better understand the mechanisms present here and to find appropriate approaches for the best use of  $\beta$ -glucan proprieties.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and GENOTOX-Royal Institute - Biotechnology Center – University of Rio Grande do Sul. Brazil.

## References

- Mizuno, T. (1995) Bioactive biomolecules of mushrooms – food, functional and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Res Int* 11:7-21.
- Delmanto, R.D.; De Lima, P.L.A.; Suguia, M.M.; Salvadori, D.M.F.; Eira, A.F.; Speit, G.; Ribeiro, L.R. (2001) Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res* 496:15-21.
- Menoli, R.C.N.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, L.R.; Gunter, S., Jordão, B.Q. (2001) Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutat Res* 496:5-13.
- Oliveira, J.M.; Jordão, B.Q.; Ribeiro, L.R.; Eira, A.F.; Mantovani, M.S. (2002) Antigenotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chem Toxicol* 40:15-20.
- Itoh, H.; Amano, H.; Noda, H. (1994) Inhibitory action of a (1-6)- $\beta$ -glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill (“Himematsutake) on Meth A fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism. *JPN J Pharmacol* 66:265-271
- Oliveira, O.M.M.F.; Velloso, J.C.R.; Fernandes, A.S.; Buffa-Filho, W.; Hakime-Silva, R.A.; Furlan, M.; Brunetti, I.L. (2007) Antioxidant activity of *Agaricus blazei*. *Fitoterapia* 78:263-264.
- Kawagishi, H.; Ryuichi, R.I.; Kanao, T.; Keishiro, T.M.; Hitoshi, S.; Hagiwara, I.T.; Nakamura, T.O. (1989) Fractionation and antitumor activity of the water insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res.* 186:267-273
- Leung, M.Y.K.; Liu, C.; Koon, J.C.M.; Fung, K.P. (2006) Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol Lett* 105: 101–114.
- Tohamy, A.A.; El-Ghor, A.A.; El-Nahas, S.M.; Noshay, M.M. (2003)  $\beta$ -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutat Res* 541:45–53.
- Oliveira, R.J.; Ribeiro, L.R.; da Silva, A.F.; Matuo, R.; Mantovani, M.S. (2006) Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol in Vitro* 20:1225–1233.
- Kada, T.; Kaneko, K.; Matsuzaki, S.; Matsuzaki, T.; Hara, Y. (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. *Mutat Res* 150: 127-132.
- Angeli, J.P.F.; Ribeiro, L.R.; M.L.C. Gonzaga, Soares, S.A.; Ricardo, M.P.S.N.; Tsuboy, M.S.; Stidl, R.; Knasmueller, S.; Linhares, R.E.; Mantovani, M.S. (2006) Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol* 22:285-291.



Gonzaga, M.L.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Heatley, F.; Soares, S.A. (2005) Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydr Polym* 60:43-49.

Matsushima,T., Hayashi,M., Matsuoka,A., Ishidate Jr,M., Miura,K.F., Shimizu,H., Suzuki,Y., Morimoto,K., Ogura,H., Mure,K., Koshi,K., Sofuni,T. (1999) Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14:569-580.

Sancar, A.; Laura A. Lindsey-Boltz, L.A.; Ünsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. (2004) Molecular Mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39–85.

Kobayashi, H.; Yoshida, R.; Kanada, Y.; Fukuda, Y.; Yagyū, T.; Inagaki, K.; Kondo, T.; Kurita, N.; Suzuki, M.; Kanayama, N.; Terao, T. (2005) Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *J Cancer Res Clin* 131:527–538.

Bulavin, D.V.; Fornace, A.J. (2004) p38 MAP Kinase's Emerging Role as a Tumor Suppressor. *Adv Cancer Res* 92:95-118.

Bernstein, C.; Bernstein, H.; Payne, C.M.; Garewal, H. (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511: 145-179.

## 4. Discussão

Vários estudos têm relacionado a citotoxicidade e a antimutagênese como propriedades distintas da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* (OLIVEIRA *et al.*, 2006; ANGELI *et al.*, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Neste trabalho, buscou-se encontrar uma relação entre essas diferentes propriedades. De acordo com nossos resultados, as atividades biológicas induzidas pela  $\beta$ -glicana são dependentes de um mesmo sistema de sinalização celular, a via MAPK p38, e aparentemente, a concentração de  $\beta$ -glicana e a presença de danos no DNA têm um papel fundamental no desencadeamento dos diferentes efeitos.

A  $\beta$ -glicana em concentrações não citotóxicas, não é capaz de induzir a paradas de ciclo celular por si mesma (fig. 6 – Capítulo I). No entanto, na presença de danos no DNA e paradas de G0/G1 induzidos por MMS, o polissacarídeo é capaz de estimular a progressão do ciclo celular e diminuir a frequência de danos no DNA (fig. 5a – Capítulo I), enquanto que doses citotóxicas da  $\beta$ -glicana são capazes de induzir a paradas de G2/M (fig. 2 – Capítulo I), o que pode ser resultado da superativação da via MAPK p38.

A  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* apresenta interessantes propriedades medicinais, dentre essas, destacam-se a antimutagênese, antitumorigênese e a atividade imunoestimuladora (OLIVEIRA *et al.*, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2005; LEUNG *et al.*, 2006). No entanto, até o momento muito pouco é conhecido a respeito dos mecanismos que medeiam essas atividades. A atividade imunoestimuladora é a melhor caracterizada, na qual a  $\beta$ -glicana é capaz de interagir com receptores específicos das células do sistema imunológico e induzir a proliferação dessas células ou a secreção de fatores importantes para a resposta imunológica (LE CABEC *et al.*, 2000).

A via MAPK p38 parece ter um papel chave na mediação da atividade imunomodulatória induzida pela  $\beta$ -glicana. PALIC *et al.* (2006) observaram que a  $\beta$ -glicana é capaz de induzir a ativação de neutrófilos de maneira dependente da MAPK p38. Esta ativação aumenta o potencial migratório dos neutrófilos, fazendo com que os mesmos atinjam o local da injúria muito mais rapidamente e eficientemente (PALIC *et al.*, 2006).

A via MAPK p38 também participa da citotoxicidade induzida pela  $\beta$ -glicana. KOBAYASHI *et al.* (2005) observaram que a  $\beta$ -glicana exibe citotoxicidade dependente da MAPK p38. Além disso, nossos resultados indicam que a inibição da via MAPK p38 interfere negativamente na citotoxicidade e antimutagênese da  $\beta$ -glicana. Esses dados sugerem que a MAPK p38 tem um papel central como mediadora das atividades biológicas da  $\beta$ -glicana.

No entanto, pouco se sabe a respeito de como a  $\beta$ -glicana desencadeia a ativação da MAPK p38. A atividade imunoestimuladora foi verificada em neutrófilos (PALIC *et al.*, 2006), cujos receptores para  $\beta$ -glicana já estão bem caracterizados, enquanto que as atividades citotóxica e antimutagênica observadas em nosso trabalho foram verificadas em células tumorais, a respeito das quais não existem referências quanto a receptores. Essa observação remete a um ponto muito importante, como a  $\beta$ -glicana induz a ativação da MAPK p38: existem receptores para este tipo de moléculas em células tumorais ou a  $\beta$ -glicana é capaz de penetrar nas células e posteriormente disparar a via MAPK p38?

Esta observação indica que ainda existem pontos fundamentais a serem estudados para que possamos compreender os mecanismos biológicos pelos quais a  $\beta$ -glicana induz seus efeitos. Outra questão importante que precisa ser elucidada refere-se ao modo como a  $\beta$ -glicana induz a ativação da MAPK p38 e os eventos que sucedem esta ativação, como por exemplo a partição, ou não de proteínas como p53. Além disso, qual é o mecanismo

preciso de antimutagênese, e se ele envolve ou não a modulação dos sistemas de reparo. A figura 8 apresenta os mecanismos que necessitam de esclarecimento com respeito da antimutagênese da  $\beta$ -glicana.

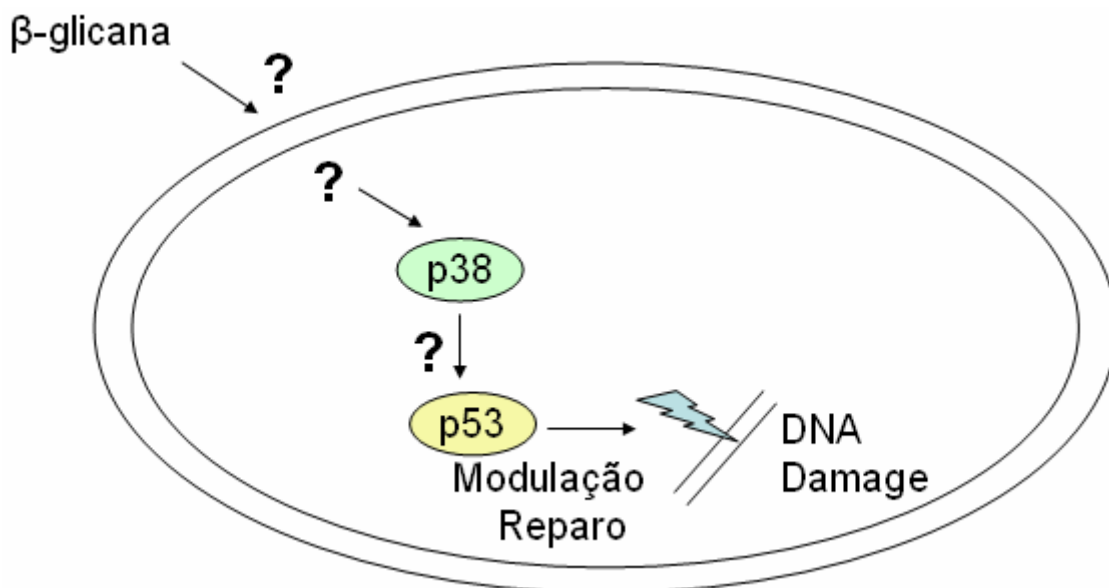


Figura 8. Mecanismos a serem esclarecidos a respeito da antimutagênese da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis*.

Os dados aqui apresentados sugerem que a  $\beta$ -glicana é capaz de induzir a antimutagênese em concentrações não-citotóxicas (por volta de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e que este efeito se deve à via MAPK p38. Deste modo, é possível que este polissacarídeo estimule a ativação da MAPK p38; conseqüentemente, as células com a via MAPK p38 estimulada podem responder mais rapidamente ao dano no DNA. Por outro lado, uma superdosagem de  $\beta$ -glicana pode superativar a via MAPK p38, levando a paradas de ciclo celular, conforme demonstrado neste trabalho.

A MAPK p38 é uma proteína de sinalização celular, que pode atuar como supressor tumoral, induzindo a paradas de G1, S e G2/M (fig. 6 - introdução) e ainda é capaz de induzir a apoptose. No entanto, essa proteína foi descoberta por atuar como um regulador positivo da proteína supressora tumoral p53 (BULAVIN & FORNACE, 2004), cujos

efeitos são indução de paradas de ciclo celular (fig. 7 - Introdução), apoptose e modulação dos sistemas de reparo (BERSTEIN *et al.*, 2002). Dessa forma, é possível que p53 esteja envolvida na antimutagênese induzida pela  $\beta$ -glicana, provavelmente modulando os sistemas de reparo, visto que a  $\beta$ -glicana é capaz de estimular a progressão do ciclo celular frente aos danos ao DNA e às paradas de G0/G1 induzidas pelo MMS (Figura 7a – Capítulo I).

Muitos dos experimentos apresentados no capítulo I foram realizados em paralelo na linhagem celular SW620 (Adenocarcinoma de Cólon Humano). No entanto, observa-se que nessa linhagem a  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* não foi capaz de induzir citotoxicidade (Figura 12 - Anexos), antimutagênese (Figura 13- anexos), ou qualquer efeito sobre o ciclo celular (Figura 14 - Anexos) e apoptose (Figura 15 – Anexos). Estes resultados apóiam a observação de que a antimutagênese e a citotoxicidade são atividades relacionadas. Além disso, indicam que podem haver outros fatores, além da MAPK p38, responsáveis pela indução das propriedades aqui relatadas. A linhagem SW620 é conhecida por ser uma linhagem mutante para p53. Segundo a IARC (2007), essa linhagem possui uma mutação de G para A no códon 273, cujo efeito é a perda de sentido (*missense*), e este pode ser o motivo pelo qual a  $\beta$ -glicana não exibe suas propriedades nessa linhagem.

Os resultados obtidos com a linhagem celular SW620 sugerem que p53 pode participar dos processos de antimutagênese e citotoxicidade. E nos permitiram formular um modelo hipotético a respeito da via de sinalização celular pela qual a  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* induz às diferentes atividades. A figura 9 apresenta dois modelos, um para a antimutagênese e outro para a citotoxicidade.

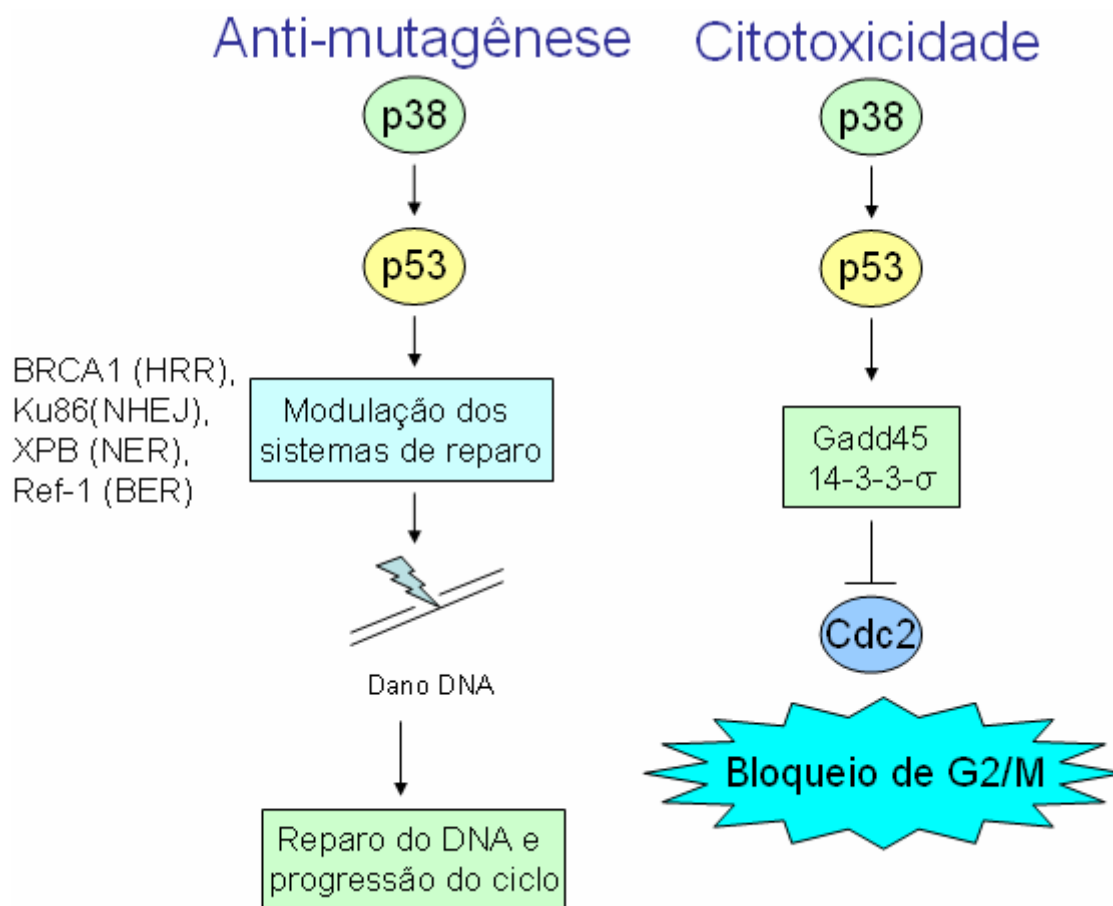


Figura 9. Modelo hipotético a respeito das vias de sinalização celular pelas quais a  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* induz a antimutagênese e a citotoxicidade.

No modelo proposto a antimutagênese da  $\beta$ -glicana é dependente da MAPK p38 e p53, a qual, segundo BERNSTEIN *et al.* (2002), é capaz de interagir e modular quatro sistemas de reparo. O mesmo autor indica várias proteínas dos diferentes sistemas de reparo capazes de interagir com p53, dentre estas destacam-se: a BRCA1, representante do reparo por recombinação homóloga (HRR); A Ku86 do reparo por recombinação não-homóloga (NHEJ); a XPB do reparo por excisão de nucleotídeos (NER); e a Ref-1 do reparo por excisão de bases (BER).

A atividade citotóxica está representada no modelo pela interação da MAPK p38 e p53, o que pode levar a paradas de G2/M de maneira dependente de Gadd45/14-3-3- $\sigma$  (fig. 7 - Introdução). BULAVIN & FORNACE (2004), reportam que a MAPK p38 pode induzir

a paradas de ciclo celular tanto por si mesma (fig. 6 - Introdução) quanto via p53, e a estas paradas podemos relacionar o efeito citotóxico da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis*.

A determinação de que sistemas de sinalização celular participam da atividade antimutagênica da  $\beta$ -glicana é fundamental para a utilização terapêutica deste composto. O conhecimento dos mecanismos que induzem a imunoestimulação permitiu o desenvolvimento de terapias mais eficientes. TSUCHIYA, *et al.* (1991), propuseram a combinação do 5-Fluorouracil (5-Fu), um quimioterápico largamente utilizado, e da  $\beta$ -glicana com o objetivo de estimular células Natural Killer (NK) e aumentar a eficácia da quimioterapia. Os autores da pesquisa observaram que a administração do polissacarídeo resultou no aumento da população de células NK em camundongos, e concluíram que a glicana poderia ser empregada após a quimioterapia com 5-Fu com o objetivo de combater o tumor e fortalecer o sistema imunológico.

Os resultados obtidos neste trabalho, somados aos já demonstrados na literatura, levam-nos a acreditar que, além de fortalecer o sistema imunológico, a  $\beta$ -glicana pode minimizar os danos ao DNA induzidos por grande parte dos quimioterápicos. Um vez que grande parte dos tumores exibem mutações na MAPK p38 ou p53 (BULAVIN & FORNACE, 2004; BERNSTEIN *et al.*, 2002), é possível que  $\beta$ -glicana não proteja o DNA dessas células quando administrada como coadjuvante em um tratamento com um quimioterápico indutor de danos ao DNA, como por exemplo a cisplatina. Por outro lado, células não-mutadas em MAPK p38/p53 poderiam ser protegidas, desta forma minimizando os danos da quimioterapia, tornando-a mais efetiva e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Neste trabalho demonstramos que os efeitos antimutagênico e citotóxico da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis* são dependentes da via MAPK p38. O efeito antimutagênico

resulta da habilidade da  $\beta$ -glicana em estimular a progressão do ciclo celular na presença de danos no DNA e paradas de G0/G1 induzidas pelo MMS. Enquanto que a citotoxicidade resulta da superativação da via MAPK p38, o que leva a paradas de G2/M. Desta forma, pretende-se agora entender melhor os possíveis mecanismos aqui discutidos, para que assim possamos planejar terapias que utilizem com eficiência as propriedades  $\beta$ -glicana.



## 5. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados nos permitem concluir que a via MAPK p38 desempenha um papel muito importante como mediadora das atividades antimutagênica e citotóxica da  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis*. Além disso, estes dados sugerem que o mecanismo de antimutagênese envolve o aumento da eficiência dos sistemas de reparo, uma vez que o polissacarídeo é capaz de promover a progressão do ciclo celular frente à parada G0/G1 induzida pelo MMS. Por outro lado, doses elevadas de  $\beta$ -glicana podem levar a uma superativação da via MAPK p38 e resultar em paradas de G2/M, induzindo conseqüentemente a inibição da proliferação celular, entendida como citotoxicidade.

Estes interessantes resultados podem ser tomados como base para novos estudos que visem compreender melhor os mecanismos moleculares responsáveis pela antimutagênese e citotoxicidade induzidas pela  $\beta$ -glicana de *A. brasiliensis*. O conhecimento dos mecanismos pelos quais estas propriedades são induzidas pode permitir a elaboração de terapias mais efetivas, capazes de explorar todo o potencial terapêutico deste composto natural.

## 6. PERSPECTIVAS

De modo a complementar o manuscrito aqui apresentado, tem-se como perspectivas:

- Determinar por Western Blot se a  $\beta$ -glicana induz a ativação (fosforilação) da MAPK p38;

- Verificar se as concentrações antimutagênicas da  $\beta$ -glicana são capazes de diminuir a citotoxicidade do MMS;

- Estudar o mecanismo pelo qual a  $\beta$ -glicana ativa a via MAPK p38. Existem receptores para este polissacarídeo em células tumorais?

- Estudar o envolvimento da proteína supressora tumoral p53 nos processos de antimutagênese e/ou citotoxicidade induzidos pela  $\beta$ -glicana;

- Analisar se os sistemas de reparo estão envolvidos no mecanismo de antimutagênese da  $\beta$ -glicana e como este polissacarídeo induz a progressão do ciclo celular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELI, J.P.F.; RIBEIRO, L.R.; M.L.C. GONZAGA, SOARES, S.A.; RICARDO, M.P.S.N.; TSUBOY, M.S.; STIDL, R.; KNASMUELLER, S.; LINHARES, R.E.; MANTOVANI, M.S. Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. **Cell Biol Toxicol**, v. 22, p. 285-291, 2006.

APPELLA, E. & ANDERSON, C.W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. **Eur J Biochem**, v. 268, p. 2764–2772, 2001.

BERNSREIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C.M.; GAREWAL, H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 511, p. 145-179, 2002.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: Sensors and Checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol**, v. 39, 615-647, 2003.

BRANCHO, D.; TANAKA, N.; JAESCHKE, A.; VENTURA, J.J.; KELKAR, N.; TANAKA, Y.; KYUUMA, M.; TAKESHITA, T.; FLAVELL, R.A.; DAVIS, R.J. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. **Genes Dev**, v. 17, p. 1969–1978, 2003.

BULAVIN, D.V. & FORNACE, A.J. p38 MAP Kinase's Emerging Role as a Tumor Suppressor. **Adv Cancer Res**, v. 92, p. 95-118, 2004.

BULAVIN, D.V.; SAITO, S.; HOLLANDER, M.C.; SAKAGUCHI, K.; ANDERSON, C.W.; APPELLA, E.; FORNACE, A.J. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates Nterminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. **EMBO J**, v. 18, p. 6845–6854, 1999.

DE FLORA, S.; BRONZETTI, G.; SOBELS, F.H. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. **Mutat Res**, v. 267, p. 153-155, 1992.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 402, p. 151-158, 1998.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis in human disease: a new skin for old ceremony? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 266, p. 699-717, 1999.

FERGUSON, L. R.. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutat Res**, v. 307, p. 395-410, 1994.

GOLDSMITH, E.J.; COBB, M.H.; CHANG, C.I. Structure of MAPKs. **Methods Mol Biol**, v. 250, p. 127-144, 2004.

GOMES, E.M., SOUTOT, P.R.F.; FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. **Mutat Res**, v. 367, p. 203-208, 1996.

GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.M.P.S.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydr Polym**, v. 60, p. 43-49, 2005.

GRUTER, A., FRIEDERICH, U.; WÜRGLER, F.E. Antimutagenic effects of mushrooms. **Mutat Res**, v. 231, p. 243-249, 1990.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Environ Mol Mutagen**, v. 15, p. 145-182, 1990.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

Hyakka, disponível em:

[www.hyakka-saen.com/agarikusu/agarikusu.htm](http://www.hyakka-saen.com/agarikusu/agarikusu.htm), acesso 01 de out. de 2007.

IARC TP53 Database, disponível em:

<http://www-p53.iarc.fr/Cell-lines.html>, acesso 03 de out. de 2007.

JOHNSON, G.L. & LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, p. 1911–1912, 2002

KADA, T. & SHIMOI, K.. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. **Bioessays**, v. 7, p. 113-115, 1987.

KAWAGISHI, H. Fractionation and antitumor activity of the waterinsoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydr Res**, n. 186, p. 267-273, 1989.

KIM, Y.W.; KIM, K.H.; CHOI, H.J.; LEE, D.S. Anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucan and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnol Lett**, v. 27, p. 483-487, 2005.

KOBAYASHI, H.; YOSHIDA, R.; KANADA, Y.; FUKUDA, Y.; YAGYU, T.; INAGAKI, K.; KONDO, T.; KURITAA, N.; SUZUKI, M.; KANAYAMA, N.; TERAOKA, T. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. **J Cancer Res Clin**, v. 131, p. 527–538, 2005.

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

KYRIAKIS, J.M.; LIU, H.; CHADEE, D.N. Activation of SAPKs/JNKs and p38s *in vitro*. **Method Mol Biol**, v. 250, p. 61–88, 2004.

LE CABEC, V.; COLS, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Nonopsonic Phagocytosis of Zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular

determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activatin. **Infect immun**, v.68, p.4736-4745, 2000.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101–114, 2006.

LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R.C. The 4th International conference of mechanisms of antimutagenesis anticarcinogenesis: a summary. **Mutat Res**, v. 350, p. 287-293, 1996.

LUIZ, R.C.; JORDÃO, B.Q.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murrill mushroom organic extracts in wild type CHO(k1) and repair deficient (xrs5) cells by chromossome aberration and sister chramatid exchangdes assays. **Mutat Res**, n.528, p. 75-79, 2003.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MITSCHER, L.A.; TELIKEPALLI. H.; MCGHEE, J.; SHANDEL, D.S. Natural antimutagenic agents. **Mutat Res**, v. 350, p. 143-152, 1996.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms – food, function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Rev Int**, v. 11, n. 1, p. 7-21, 1995.

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

NYBERG KA, MICHELSON RJ, PUTNAM CW, WEINERT TA. **Annu Rev Genet**, v. 36, p. 617-56, 2002.

OLIVEIRA, J.M., JORDÃO, B.Q., RIBEIRO, L.R., EIRA, A.F., MANTOVANI, M.S., Antigenotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. **Food Chem Toxicol**, n.40, p.15-20, 2002.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; DA SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicol in Vitro** v. 20, p. 1225–1233, 2006

PALIC, D.; ANDREASEN, C.B.; HEROLT, D.M., MENZEL, B.W.; ROTH, H.A. Immunomodulatory effects of  $\beta$ -glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1982). **Dev comp immunol**, v.30, p.871-830, 2006.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Determinação da concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murril por método enzimático. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 23, p. 312-316, 2003.

Review of Literature, disponível em:

<http://herkules oulu.fi/isbn9514266676/html/i267388.html>, acesso 01 de out. de 2007.

SANCAR, A.; LAURA A. LINDSEY-BOLTZ, L.A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular Mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 39–85, 2004.

SANDULA, J.; MACHOVÁ, E.; HRIBALOVÁ, V.. Mitogenic activity of particulate yeast  $\beta$ -(1→3)-D-glucana and its water-soluble derivatives. **Int J Biol Macromol**, v. 17, p. 323-326, 1995.

SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNECEVIC-VUKCEVIC, J. Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. **Mutat Res**, v. 402, p. 52-57, 1998.

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. e TAKAHASHI, T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. **J Gastroen Hepatol**, v. 15, n. 9, p. 1079-1086, 2000.

TOHAMY, A.A.; EL-GHOR, A.A.; EL-NAHAS, S.M.; NOSHY, M.M.  $\beta$ -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. **Mutat Res**, v. 541, p. 45–53, 2003.

TRICHOPOULOU, A.; KATSOUYANNI, K.; STUVER, S.; TZALA, L. GNARDELLIS, C.; RIMM, E.; TRICHOPHOULOS, D. Consumption of olive oil and especific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. **J Natl Cancer Inst**, n. 87, p. 110-116, 1995.

TSUCHIYA, Y.; MATSUTANI, M.; INOUE, M.; SATO, S.; ASANO, T. YAJIMA, M. Effect of a glucan, sizofiran, on natural-killer activity of 5-fluorouracil-treated murine bone marrow cells. **Cancer Immunol Immun**, v. 34, p. 17-23, 1991.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307–310, 2000

VON BORSTEL, R. C. The relation of activation and inactivation to antimutagenic process. In: Shankel, D. M.; Hatman, P. E.; Kada, T.; Hollaender, A. (Ed.) Antimutagenis and anticarcinogenesis mechanisms. **New York: Plenum Press**, p. 39-45, 1996.

VOUSDEN, K.H., & LU, X. Live or let die: The cell's response to p53. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 594–604, 2002.

ZIEGLER U. & GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v.19, p. 124-128, 2004.

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





## 8. ANEXOS

### 8.1. Resultados Complementares

Os resultados aqui apresentados têm o objetivo de complementar os dados apresentados no Capítulo I, assim como sustentar alguns argumentos da discussão.

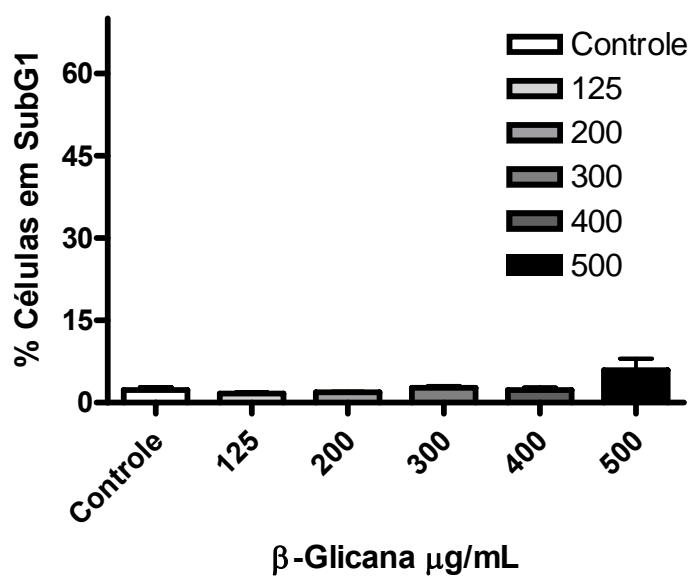


Figura 10: Efeito da  $\beta$ -glicana sobre a população SubG1 de H460 pelo ensaio de citometria de fluxo. As células (15.000) foram analisadas após um período de tratamento de 24h. (Figura referente a *data not shown* – Capítulo I)

A figura 10 foi citada na discussão e refere-se a população SubG1, indicativa de apoptose.

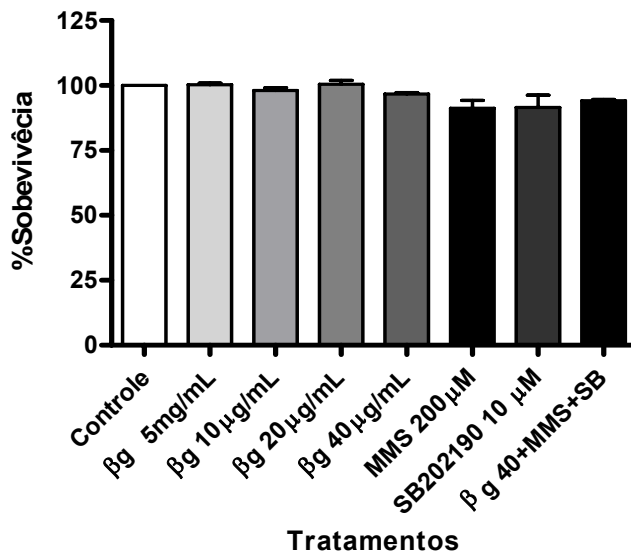


Figura 11: Citotoxicidade da β-glicana na linhagem celular H460 pelo ensaio SRB. As células ( $2.5 \times 10^4$ ) foram tratadas com: βg = β-glicana, nas concentrações especificadas; Methyl Methanesulfonate (MMS) na concentração de 200 µM e SB = SB 202190 na concentração de 10 µM (Figura referente a *data not shown* – Capítulo I).

A figura 11 foi citada no capítulo I, e demonstra que todas as associações empregadas nos ensaios de mutagênese e antimutagênese não apresentaram citotoxicidade.

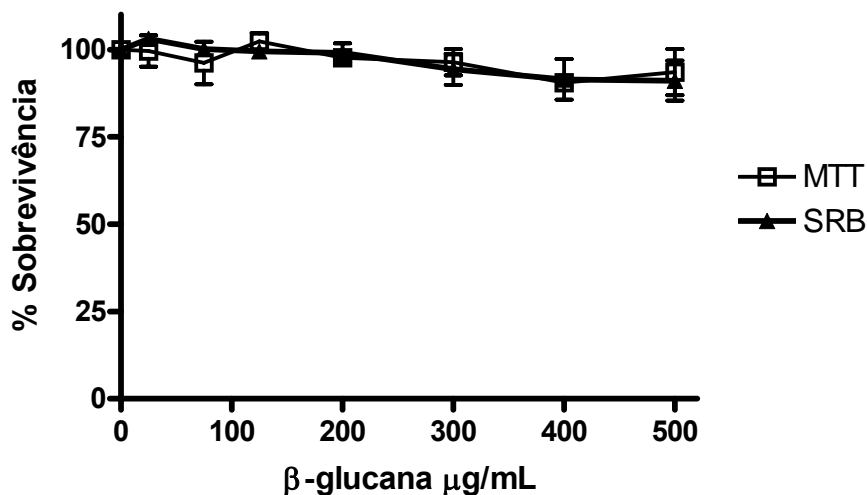


Figura 12. Citotoxicidade da β-glicana na linhagem celular SW620 com 24 horas de tratamento. A percentagem de inibição do crescimento celular induzida pela β-glicana pelos ensaios de SRB (▲) e MTT (□).

As figuras 12, 13, 14 e 15 foram citadas na discussão e indicam que a  $\beta$ -glicana não é capaz de induzir a citotoxicidade, antimutagenese ou apoptose na linhagem celular SW620.

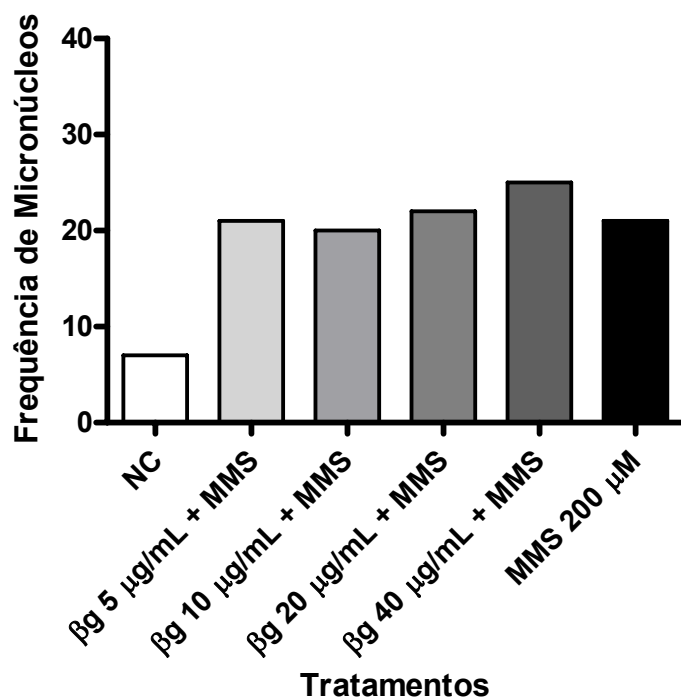


Figura 13. Efeito antimutagênico da  $\beta$ -glicana na linhagem celular SW620 empregando o teste de micronúcleos. O ensaio foi realizado com 3 horas de tratamento seguidas de 24 horas de tempo de recuperação. Resultados referentes a um experimento.

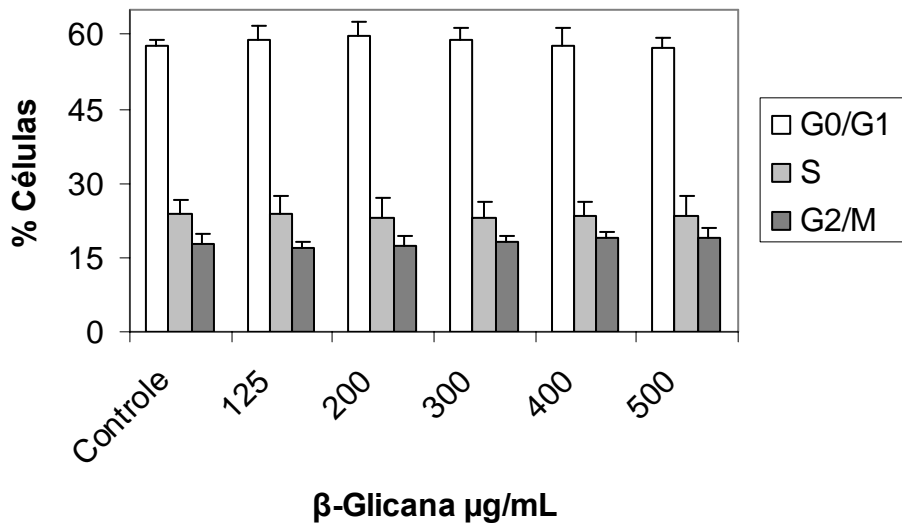


Figura 14: Efeito da β-glicana sobre o ciclo celular da linhagem SW620 pelo ensaio de citometria de fluxo. As células (15.000) foram analisadas após um período de tratamento de 24 h.

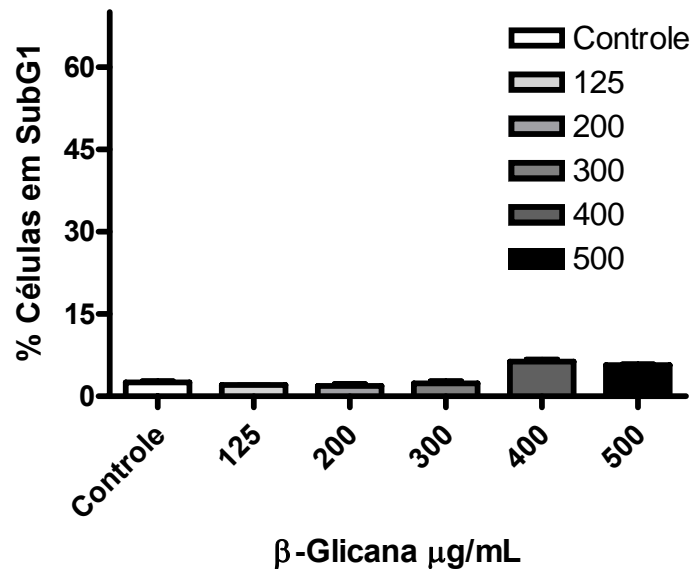


Figura 15: Efeito da β-glicana sobre a população SubG1 da linhagem SW620 pelo ensaio de citometria de fluxo. As células (15.000) foram analisadas após um período de tratamento de 24 h.

## 8.2. CURRICULUM VITÆ

### CURRICULUM VITÆ - resumido

SOUSA, F.G.

#### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Fabrício Garmus Sousa

**Local e data de nascimento:** Chapecó - SC, Brasil, 24 de dezembro de 1983.

**Endereço Profissional:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS,

Centro de Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421

Agronomia - Porto Alegre

91501-970, RS – Brasil

**Telefone Profissional:** +55 (051) 3308 608

**E-mail:** [fabriciobioch@yahoo.com.br](mailto:fabriciobioch@yahoo.com.br)

#### 2. FORMAÇÃO

- |           |  |
|-----------|--|
| 2002-2005 | Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura<br>Universidade Comunitária Regional de Chapecó,<br>UNOCHAPECO, Chapecó-SC, Brasil.              |
| 2006      | Mestrado em Biologia Celular e Molecular – <i>stricto sensu</i><br>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS,<br>Porto Alegre-RS, Brasil. |

### 3. ESTÁGIOS

- 2002-2004 Estágio remunerado de regime parcial (20 horas semanais)  
Companhia Catarinense de Aguas e Saneamento – CASAN  
Atividade de auxiliar nos laboratórios físico-químico e microbiológico
- 2003-2003 Estágio remunerado de regime parcial (20 horas semanais)  
Universidade Comunitária Regional de Chapecó – UNOCHAPECO  
Atividade de auxiliar de laboratório no Centro de Ciências da Saúde
- 2004-2006 Estágio remunerado de regime parcial (20 horas semanais)  
Instituto de Patologia do Oeste  
Atividade de auxiliar de macroscopia e coloração histológica
- 2005-2005 Estágio de Iniciação Científica (16 horas semanais)  
Agência de Fomento: Universidade Comunitária Regional de Chapecó – UNOCHAPECO  
Projeto: Avaliação do potencial mutagênico (produção de micronúcleos) de extratos brutos do chá-de-bugre (*Casearia sylvestris* Sw.) sobre *Allium cepa*

### 4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

SOUSA, F.G.; SCHNEIDER, N.F.Z.; MENDES, C.E.; MOURA, N.F. DERNANDIN, R.B.N. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p.376-378, 2007.

SOUSA, F.G.; DENARDIN, R.B.N.; MOURA, N.F.; DREVS, S. Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. **Allelopathy Journal**, v.20, p. 195-202, 2007.

## 5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SOUSA, F. G.; MATUO, R.; SCHNEIDER, N. Z. F.; MOURA, N.F.; DENARDIN, R.B.N.; MANTOVANI, M.S. Avaliação da clastogenicidade e anticlastogenicidade do óleo de *Casearia sylvestris in vitro*, pelo ensaio de aberrações cromossômicas. In: IX Seminário de Iniciação Científica, 2005, Chapecó - SC.

SOUSA, F.G.; MOURA, N.F.; DENARDIN, R.B.N. Avaliação da toxicidade do extrato bruto de *Casearia sylvestris* pela inibição do crescimento radicular em *Allium cepa* In: Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba - PR.

SOUSA, F.G.; MASSIGNANI, F.; CONFORTIN, A.C. Concepções dos alunos e professores do ensino médio sobre o tema câncer em escolas de Chapecó In: Curso de Verão: I Genética e Biologia Molecular nas Férias, 2005, Londrina - PR..

SOUSA, F. G.; MATUO, R.; SCHNEIDER, N.Z.F.; DENARDIN, R.B.N.; MANTOVANI, M.S. Estudo da clastogenicidade e anticlastogenicidade do óleo de *Casearia sylvestris*, em células metabolizadoras In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia – SP.

SOUSA, F.G.; MOURA, N.F.; DENARDIN, R.B.N., PERINI, M.V. Estudo da genotoxicidade do extrato bruto de *Casearia sylvestris* usando o teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* In: IX Seminário de Iniciação Científica, 2005, Chapecó – SC.

SOUSA, F.G.; MATUO, R.; GRIVICICH, I.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. Atividade antitumoral do polissacarídeo  $\beta$ -(1-6)-D-glucan extraído de *Agaricus blazei* e sua possível relação com p53 In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre – RS.