



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
*Agaricus brasiliensis* EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

**PAULA HAUBER GAMEIRO**

**Monografia de conclusão de curso**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Campus Universitário s/nº**

**Caixa Postal: 354 CEP: 96010-900**

**Pelotas – RS – Brasil**

**pully@brturbo.com.br**

**2005**

**EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
*Agaricus brasiliensis* EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

**PAULA HAUBER GAMEIRO**

Monografia apresentada ao Colegiado  
do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Pelotas, no  
processo de obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: José Soares do Nascimento

**Pelotas - RS  
Julho de 2005**

## **Agradecimentos**

Aos meus amados pais, João Luis Prietto Gameiro e Mara Eunice Hauber Gameiro, por sempre me incentivarem a lutar pelo meu ideal, pelo apoio e incentivo espiritual sempre que necessitei em vários momentos de minha vida e, principalmente, por me ensinarem o importante valor de se viver em uma família unida.

À minha querida avó Rosália Moreira Hauber, pela amizade e por estar ao meu lado apostando sempre no meu sucesso.

Ao meu amado avô Germano Hauber (*in memoriam*), meu eterno agradecimento pela ajuda que sempre me deu e que com certeza ainda continuará dando, mesmo estando no plano espiritual.

Ao meu irmão Gustavo Hauber Gameiro, pelo estímulo que tem me dado para que eu pudesse chegar ao final deste trabalho.

Ao meu irmão mais velho Augusto Hauber Gameiro, minha cunhada Mariana e minha querida sobrinha Manoela Perozzi Gameiro, que mesmo à distância estão sempre me apoiando e me dando carinho ao longo deste período.

À minha segunda mãe Maria Luiza de Souza, pelo apoio constante onde a amizade, o carinho e a união sempre estiveram presentes.

Ao meu namorado Rafael Dutra de Armas, por todo o apoio, carinho e companheirismo, que foi a motivação e a força necessária para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Soares do Nascimento, pela amizade, orientação neste trabalho e por fazer parte da banca examinadora.

À Profa. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha, pela amizade e incentivo fornecidos durante a realização deste trabalho, e também por fazer parte da banca examinadora.

À Prof. Rita Aloma Packeiker Vianna, que fez parte da banca examinadora, por sua disposição em analisar este trabalho, trazendo importantes contribuições para a sua finalização.

Ao Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da FMRP/USP, na pessoa da Profa. Dra. Catarina Satie Takahachi, por permitir a realização dos experimentos deste trabalho sob sua orientação, durante um estágio realizado em fevereiro deste ano. Além do apoio, amizade e incentivo dos amigos desse

laboratório, Cássia, Cleide, Ana Cláudia, Gustavo, e em especial à Raquel Alves dos Santos.

Agradeço a DEUS, é claro, pelas energias fornecidas para que eu pudesse realizar e finalizar este trabalho.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

## Sumário

Agradecimentos.....	ii
Sumário.....	iv
Resumo.....	v
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Os fungos.....	3
2.1.1. O cogumelo medicinal <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	4
2.1.1.1. Características morfológicas.....	4
2.1.1.2. Reprodução.....	5
2.1.1.3. Ecologia.....	6
2.1.1.4. O Cultivo de <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	6
2.1.1.5. Importância nutricional.....	6
2.1.1.6. Importância medicinal.....	8
2.1.1.6.1. Imunomodulação “ <i>in vivo</i> ”.....	9
2.1.1.6.2. Efeito antimutagênico e antitumoral.....	10
2.2. Genotoxicidade.....	11
2.2.1. Mutagênese.....	11
2.2.2. Antimutagênese.....	12
2.2.3. Mecanismos de reparo.....	12
2.2.4. Testes de detecção de dano genético em humanos.....	13
2.2.4.1. Aberrações cromossômicas.....	13
2.2.4.1. Ensaio Cometa.....	14
2.3. O antitumoral doxorrubicina.....	15
2.4. Considerações gerais sobre câncer.....	16
2.4.1. Causas do câncer.....	17
2.4.2. Genes envolvidos na carcinogênese.....	18
2.4.3. Prevenção do câncer.....	19
3. Materiais e métodos.....	21
3.1. Culturas de linfócitos de sangue periférico humano.....	21
3.2. Substâncias utilizadas.....	21
3.2.1. Agente mutagênico.....	21
3.2.2. Solução de <i>Agaricus brasiliensis</i> .....	22
3.3. Grupos de tratamento.....	22
3.4. Testes realizados.....	25
3.4.1. Aberrações cromossômicas.....	25
3.4.2. Ensaio cometa.....	27
3.5. Porcentagem de redução de danos.....	27
3.6. Análise Estatística.....	29
4. Resultados e discussão.....	30
4.1. Aberrações cromossômicas (ACs).....	30
4.2. Teste cometa.....	33
5. Conclusões.....	37
6. Referências.....	38
7. ANEXOS.....	48

## **Resumo**

---

### **EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Agaricus brasiliensis* EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

Autor: Paula Hauber Gameiro

Orientador: José Soares do Nascimento

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* (cogumelo-do-sol), nativo do sudeste do Brasil é conhecido por suas propriedades medicinais, especialmente como antimutagênico e antitumoral, tem sido motivo de várias pesquisas. Neste trabalho, foi avaliado o efeito antimutagênico do extrato aquoso de *A. brasiliensis* em culturas de linfócitos humanos tratados com o quimioterápico doxorrubicina (DXR). Os extratos preparados nas temperaturas de 4° e 25°C foram utilizados no pré-tratamento das culturas conforme o protocolo experimental de antimutagenicidade. Os testes utilizados foram: aberrações cromossômicas (ACs) e teste cometa. O teste de Acs mostrou-se mais sensível na detecção de antimutagenicidade do *A. brasiliensis* do que o ensaio cometa. O *A. brasiliensis* pode ser utilizado juntamente com o antimutagênico DXR, exercendo efeito protetor nas temperaturas de 4 e 25°C.



## 1. Introdução

Os cogumelos são fungos ainda pouco conhecidos pela sociedade brasileira, porém sabe-se que índios utilizavam algumas espécies na alimentação e também no combate a hemorragias, cólicas, feridas e outras doenças. Eles denominavam os fungos de urupê, em tupi-guarani que significa cogumelos e urupê-tinga, urupê-piranga como fungos distintos o que mostra uma noção de taxonomia. Esses conhecimentos como muitos outros dos indígenas, foram praticamente perdidos e não fazem parte da cultura brasileira atual. Outros povos como asiáticos, mexicanos e europeus herdaram o hábito de consumir os cogumelos, para enriquecer a alimentação.

Através de relatos da antiguidade que foram de grande importância, estudiosos voltaram suas atenções às propriedades medicinais encontradas nos cogumelos, utilizando bases científicas para desmistificar as crenças em torno dos mesmos. Os alvos das pesquisas foram e ainda são as substâncias capazes de combater as diversas doenças espalhadas pelo mundo, sem causar efeitos colaterais ao organismo, como é o caso da busca da cura contra o câncer.

O cogumelo *Agaricus brasiliensis*, conhecido popularmente como “cogumelo-do-sol”, vem sendo relatado como um produto com propriedades medicinais, chamando a atenção da comunidade científica de instituições mundo todo, inclusive no Brasil. Estas propriedades medicinais são atribuídas a polissacarídeos, atuando como substâncias antitumoral e na imunomodulação do sistema imunológico (WASSER & WEIS, 1999). Este fungo foi descoberto, na década de 1960, pelo imigrante japonês T. Furumoto, na região serrana da Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo, na cidade de Piedade (COLAUTO *et al.*, 2002). Em 1972, Sr. Furumoto, enviou amostras do fungo ao Japão para serem analisadas, tendo sido classificado como *A. blazei* Murril e como *A. sylvaticus* pelo Instituto Real de Botânica, na Inglaterra. Posteriormente, as espécies encontradas no Brasil foram reclassificadas como *A. brasiliensis* S. Wasser *et al.* (WASSER *et al.*, 2002).

O Brasil tem se destacado no cultivo de *A. brasiliensis*, devido às condições climáticas favoráveis, sendo mais cultivado nos Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Outros países produtores são China, Japão e Coréia (EIRA, 2003). *A. brasiliensis* tem sido empregado na dieta, principalmente em pratos japoneses, chineses e até mesmo nos países ocidentais devido à sua forte fragrância adocicada e por sua excelente textura. Também tem sido utilizado em forma de chá, no combate ao

estresse físico e emocional, estimulante do sistema imunológico, melhora da qualidade de vida de diabéticos, redução de colesterol, combate às doenças como úlcera gástrica, osteoporose, além de apresentar um possível efeito anticarcinogênico e antimutagênico (BELLINI *et al.*, 2003; MENOLI *et al.*, 2001). Estes efeitos servem para indicar se uma determinada substância tem a capacidade de diminuir ou evitar o surgimento da proliferação descontrolada das células e de danos a nível genético.

O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito antimutagênico do extrato aquoso de *A. brasiliensis* em cultura de linfócitos humanos, através dos testes de aberrações cromossômicas e cometa.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Os fungos**

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares ou pluricelulares, aclorofilados, quimiorganotróficos e com uma diversidade morfológica própria para cada gênero. Seu modo de nutrição, por absorção, é responsável tanto pelos aspectos positivos quanto negativos atribuídos aos fungos. Eles podem ser extremamente benéficos, pois muitas das exoenzimas são responsáveis pela decomposição dos resíduos de plantas e animais mortos, tornando possível a reciclagem de elementos químicos. O uso industrial de fungos e de suas enzimas tem sido amplamente explorado, pois são utilizados na produção de vinhos, cervejas, queijos e vários antibióticos. No entanto, os fungos também secretam enzimas que degradam equipamentos e produtos industrializados, causam emboloramento de alimentos, são causadores de micoses em humanos e animais, quando colonizam o tecido externo ou quando os esporos são inalados causando micoses profundas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; RAVEN *et al.*, 2001).

Existe uma grande diversidade de fungos que podem ser encontrados em todos os ambientes terrestres, especialmente no solo. Os fungos apresentam dimensões microscópicas. Entretanto, tornam-se visíveis à olho nu ao formarem colônias. Alguns fungos, durante a fase reprodutiva apresentam estruturas macroscópicas, denominadas de cogumelos, especialmente incluídos nos filos Ascomycota e Basidiomycota (PEREIRA & PUTZKE, 1990).

Dentre os indivíduos presentes no grupo dos Basidiomycotas, existem 22.300 espécies, incluindo espécies silvestres saprófitas, micorrízicos e fitoparasitas. Os cogumelos podem ser tóxicos, alucinógenos, venenosos, comestíveis e medicinais (PUTZKE & PUTZKE, 1998).

### 2.1.1. O cogumelo medicinal *Agaricus brasiliensis*

O cogumelo *A. brasiliensis* pertence à ordem Agaricales, possuindo corpo de frutificação visível ao olho nu. Esta ordem tem sido bastante estudada, compreende 300 gêneros e aproximadamente 5.000 espécies em termos mundiais (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). No Brasil são conhecidos 136 gêneros e 1011 espécies, de acordo com levantamento da produção científica referente aos anos de 1900-1991 realizado por Putzke (1994). Entretanto, estes números vêm sendo alterados a cada dia com as descrições de novas espécies (HALLING, 1992; CANTRELL & LODGE, 2001). A classificação e descrição das espécies desta ordem baseiam-se, fundamentalmente, nos caracteres morfológicos, anatômicos e bioquímicos dos basidiomas (SINGER, 1972; PEREIRA, 1984).

A classificação geral de *A. brasiliensis*, conforme Wasser *et al.*, (2002) é a seguinte:

<b>REINO:</b>	Fungi
<b>DIVISÃO:</b>	Basidiomycota
<b>SUB-DIVISÃO:</b>	Homobasidiomycetidade
<b>ORDEM:</b>	Agaricales
<b>FAMÍLIA:</b>	Agaricaceae
<b>GÊNERO:</b>	<i>Agaricus</i>
<b>ESPÉCIE:</b>	<i>Agaricus brasiliensis</i>
<b>NOMES POPULARES:</b>	Cogumelo-do-sol, cogumelo da vida, <i>Agaricus sylvaticus</i> , himematsutake, etc.

#### 2.1.1.1. Características morfológicas

As características morfológicas do *A. brasiliensis*, segundo Wasser *et al.*, (2002), são:

- **Píleo (chapéu):** tamanho de 5 a 11 cm de diâmetro, semi-globuloso quando maduro (aberto); coloração marrom claro apresentando pequenos flocos brancos no topo;
- **Estipe (pé):** 6-13 cm de comprimento e 1-2 cm de diâmetro; coloração

esbranquiçada e amarelada quando danificado mecanicamente;

- **Anel:** esbranquiçado, presença de flocos escamosos;
- **Lamelas:** dispostas muito próximas uma das outras, não conectadas ao estipe, sua coloração varia de uma cor esbranquiçada para um cinza esbranquiçado;
- **Esporos:** têm forma elíptica variando de 4,9 a 6,4 por 4,0 a 4,7  $\mu\text{m}$ , coloração marrom escuro e parede espessa.

### 2.1.1.2. Reprodução

O ciclo de vida do *A. brasiliensis* começa quando um cogumelo adulto libera os milhões de basidiósporos no ar, que são facilmente dispersos pelo vento. Os basidiósporos são formados na basídia, que são sustentadas pelas lamelas. Quando dois basidiósporos germinam dão origem a hifas haplóides com células uninucleadas, que em conjunto são denominadas de micélio primário. Já quando duas hifas compatíveis originárias de basidiósporos distintos se encontram ocorre a fusão dos citoplasmas (plasmogamia), resultando em células binucleadas formando o micélio secundário. Este, sob as condições ambientais favoráveis, passa a formar os primórdios, que são diferenciações do micélio vegetativo, caracterizada por espessamento, até a formação do basidioma (corpo de frutificação) (Figura 1). A fusão dos núcleos na célula dicariótica ocorre nas lamelas, resultando um zigoto (2n), onde ocorre meiose, resultando quatro novos núcleos haplóides. Estes núcleos, após serem envolvidos pelo protoplasma, formam quatro novos basidiósporos (EIRA, 2003).

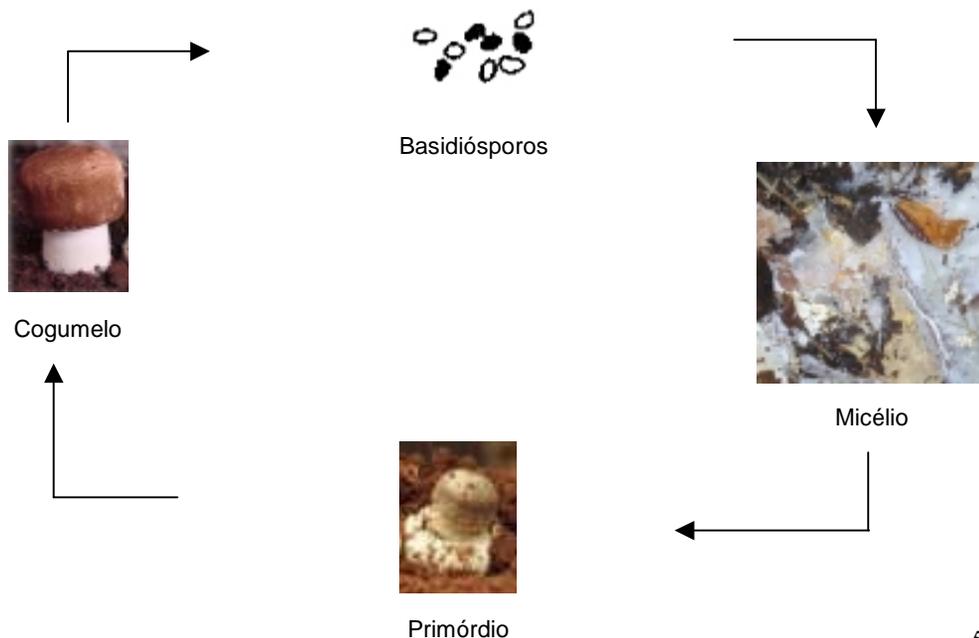


Figura 1. Ciclo de vida de *A. brasiliensis*

### **2.1.1.3. Ecologia**

As condições climáticas da região para a frutificação de *A. brasiliensis* nativo, são relativamente quente e úmida, com temperaturas variando entre 20 a 30°C e a umidade relativa do ar é extremamente alta, entre 85 e 90%. Para que o cultivo deste cogumelo seja mais eficiente, é necessário que as áreas de cultivo apresentem condições semelhantes, favoráveis à produtividade. O local para o cultivo não deve apresentar incidência de ventos fortes, luz direta e deve estar livre de qualquer tipo de contaminação (BRAGA *et al.*, 1998).

### **2.1.1.4. O Cultivo de *Agaricus brasiliensis***

Por se tratar de cogumelo do mesmo gênero, a técnica de cultivo de *A. brasiliensis* em muito se assemelha a do *A. bisporus* (EIRA, 2003), sendo este cultivado em palhas de gramíneas compostadas e pasteurizadas, e mantido em condições controladas de temperatura e umidade.

O cultivo de cogumelos é um método artificial que mimetiza a reprodução dos mesmos sob condições físicas, químicas e biológicas encontradas no ambiente de origem. Essas espécies são classificadas como cogumelos cultivados, na qual necessitam de conhecimento técnico para que se possa manter a qualidade do produto e a produtividade, investindo assim, no seu potencial econômico.

Em moldes comerciais, o cultivo de *A. brasiliensis*, é recente e as técnicas de cultivo são ainda empíricas. Porém, tem-se conseguido bons resultados de produtividade (10 – 15% em cogumelos frescos) e qualidade final do produto por parte de alguns produtores. Apesar disto, a produtividade do *A. brasiliensis* é muito variável, principalmente devido aos fatores ambientais e aos relacionados ao tipo de substrato, camada de cobertura e características genéticas de linhagens, que são fatores ainda em estudo e, desta forma, torna-se impraticável estimar níveis de produtividade em cultivos deste cogumelo, além da informalidade comercial do mercado (EIRA, 2003).

### **2.1.1.5. Importância nutricional**

O valor nutritivo dos cogumelos é muito semelhante ao das horaliças (Tabela 1),

contendo certas particularidades como alto teor protéico e baixo valor calórico. Geralmente, os cogumelos em fase mais jovens, quando ainda apresentam o píleo fechado, são ainda mais ricos em proteínas comparados com os mais adultos, onde o véu parcial foi rompido e as lamelas estão expostas (EIRA, 2003).

**Tabela 1. Composição química dos cogumelos comestíveis em relação a outros alimentos (% peso fresco).**

	Água	Calorias	Proteínas	Carboidratos	Gorduras
Cogumelos	90-98	28	2,8 – 4,8	4,4	0,3
Ovos	74	163	12,9	9,0	11,5
Leite	87	65	3,5	4,9	3,5
Cenoura	88	42	1,1	9,7	0,2

Fonte: Bononi *et al.* (1999).

Os cogumelos são ricos também em minerais, vitaminas, ácido pantotênico, ácido fólico e, ainda, são fontes de quase todos os aminoácidos (Tabela 2) (EIRA, 2003).

**Tabela 2. Composição média do cogumelo *A. brasiliensis* desidratado.**

Constituinte	Valor
Água	7,5%
Proteína	36,7%
Gordura	3,4%
Fibra	6,8%
Cinzas	7,3%
Açúcares	38,3%
Fósforo	939 mg
Ferro	18,2 mg
Cálcio	41,6 mg
Vitamina B <sub>1</sub>	0,48 mg
Vitamina B <sub>2</sub>	2,84 mg
Vitamina D	354 mg
Niacina	40,9 mg

Fonte: COPERCOM, citado por EIRA (2003).

Entre os cogumelos comestíveis e medicinais, o *A. brasiliensis* é mais rico em proteínas comparando com outros cogumelos como *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* e similar em fibras, minerais e gorduras (BRAGA *et al.*, 1998).

#### 2.1.1.6. Importância medicinal

Além das propriedades nutricionais, alguns cogumelos apresentam também propriedades medicinais, destacando-se *Ganoderma lucidum*, *Auricularia auricula*, *L. edodes*, *Flammulina velutipes*, *Calvatia gigantea*, *Pholiota nameko*, *P. ostreatus*, *A. brasiliensis* (CHANG, 1999). A utilização de cogumelos na medicina popular teve início em povos da Antiguidade e entre as comunidades indígenas. Na medicina popular, são várias as indicações terapêuticas à base de cogumelos no combate as hemorragias, cólicas, feridas, asma e outras (Tabela 3). Alguns índios brasileiros utilizavam *Pycnoporus sanguineus* para a cicatrização de feridas. Muitas dessas substâncias utilizadas na medicina popular passaram a ter comprovação científica (BONONI *et al.*, 1999).

**Tabela 3. Utilização medicinal de alguns cogumelos.**

Espécie	Uso
<i>Auricularia fuscosuccinea</i>	Fortificante da circulação sanguínea
<i>Calvatia cyathiformis</i>	Cicatrizante, coagulante
<i>C. gigantea</i>	Inflamação, sangramentos, limpeza dos pulmões e garganta
<i>Claviceps purpurea</i>	Ajuda em partos
<i>Clitocybe gibba</i>	Febre
<i>Coprinus comatus</i>	Hemorroidas
<i>Fomes officinalis</i>	Purgante, tuberculose, sudorese noturna, diurético
<i>F. fomentarius</i>	Hemorragia
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Hemorragia
<i>Ganoderma lucidum</i>	Tônico, inflamações, diurético
<i>G. appanatum</i>	Câncer esofágico
<i>Geastrum saccatum</i>	Hemorragia, distúrbios uterinos
<i>Lentinus edodes</i>	Evita doenças causadas pela falta de vitamina D
<i>Polyporus coccineus</i>	Hemorragia, distúrbios uterinos

<i>P. suaveolens</i>	Tuberculose, sudorese noturna
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Hemoptise, verrugas
<i>Trametes cupreorosea</i>	Doenças próprias do sexo feminino
<i>Ustilago maydis</i>	Espinhas, escorioses, queimaduras, ajuda em partos

Fonte: Bononi et al. (1999).

Pesquisadores revelaram a ação de polissacarídeos antitumorais ao pesquisarem estes compostos em Basidiomycotas. Porém esta atividade antitumoral nem sempre pode ser evidenciada, devido à solubilidade em água, o tamanho molecular e o tipo de ligação química (MIZUNO *et al.*, 1995). Dentre esses polissacarídeos extraídos de diferentes tipos de cogumelos, destaca-se especialmente o complexo glicoprotéico de ligação (1→6) – β –D – glucan-proteína, extraído do “cogumelo-do-sol” (*A. brasiliensis*) (OHNO *et al.*, 2001; TAKAKU *et al.*, 2001). Este complexo glicoprotéico é formado por 50,2% de carboidratos e 43,3% de proteínas, sendo responsável pela inibição do crescimento do sarcoma-180 implantado em ratos, desenvolvendo, desta maneira, propriedades imunomodulatórias (BELLINI *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003).

Cabe salientar a presença de outros dois componentes em *A. brasiliensis*, tais como: os lipídios, especialmente o ácido linoléico que apresenta evidências de ser bactericida e ser o principal lipídio com atividade antimutagênica (OOIL & LIU, 1999), além de uma grande quantidade de ergosterol que é o precursor da vitamina D, essencial no combate à osteoporose (LUIZ *et al.*, 2003).

#### **2.1.1.6.1. Imunomodulação “*in vivo*”**

O sistema imunológico é responsável pela defesa do corpo humano contra enfermidades. É constituído por um sistema de células distribuídas numa rede complexa de órgãos, como o fígado, o baço, os gânglios linfáticos, o timo, a medula óssea e circulando na corrente sanguínea. Esses órgãos são denominados órgãos linfóides e estão relacionados com o crescimento, o desenvolvimento e a distribuição das células especializadas na defesa do corpo contra os ataques de “invasores estranhos” (STITES *et al.*, 2000).

As principais células do sistema imunológico envolvidas no combate às células tumorais são: os linfócitos T, os macrófagos, os mastócitos e as células “natural killer” (NK). Essas últimas estão presentes no sistema imunológico onde se apresentam em grânulações no citoplasma, as perforinas, com o poder de destruição de células

neoplásicas de uma maneira inespecífica (ISHIGAMI *et al.*, 2000; GENNARI *et al.*, 2001). As células NK são muito susceptíveis às espécies reativas tóxicas de oxigênio, perdendo a sua capacidade de aderir às células cancerosas e, conseqüentemente, perdendo a sua citotoxicidade (TANAKA *et al.*, 2000). Porém, várias pesquisas já foram realizadas a fim de comprovar a ativação das células do sistema imunológico pelo extrato de *A. brasiliensis* (COSISKI *et al.*, 2000).

#### **2.1.1.6.2. Efeito antimutagênico e antitumoral**

Estudos vêm demonstrando que a ação dos princípios ativos contra células tumorais ocorre de forma indireta, através da ativação das células do sistema imunológico como os macrófagos, linfócitos, neutrófilos e principalmente as células “natural killer”. Com base no estudo de Fujimiya *et al.* (1998), estas células foram capazes de inibir diretamente o crescimento das células tumorais *in vitro* pela indução de apoptose.

O efeito mutagênico é a conseqüência de danos genéticos causados por agentes físicos, químicos e biológicos, induzido por mutações nas células de um organismo. Já o efeito antimutagênico é o contrário, tem ação inversa impedindo a formação das mutações causadas por um determinado agente mutagênico. Para avaliar este efeito são utilizados testes como o de micronúcleo, teste do cometa e de aberrações cromossômicas (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O cogumelo *A. brasiliensis* preparado a diferentes temperaturas e fase de desenvolvimento, promoveu quimioproteção contra o agente metilmetanosulfonato em células *in vitro* (GUTERREZ *et al.*, 2003). Este efeito também foi eficaz quando testado nas mesmas condições, porém, *in vivo* contra o agente alquilante ciclofosfamida, avaliada pelo teste do micronúcleo, em células da medula óssea de camundongos (DELMANTO *et al.*, 2001), e contra dietilnitrosamina em lesões pré-neoplásicas no fígado de ratos Wistar, nas etapas de pré e pós-iniciação do tratamento com a solução do cogumelo (BARBISAN *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003). Os resultados mostraram que o tratamento com as soluções aquosas de *A. brasiliensis*, apesar de não causarem toxicidade hepática e renal nos ratos, também não alteraram o desenvolvimento dos focos hepáticos pré-neoplásticos, iniciados pela dietilnitrosamina (BARBISAN *et al.*, 2003). Atualmente, as pesquisas estão sendo direcionadas para a aplicação do extrato de *A. brasiliensis* em cultura de células humanas *in vitro*

(EIRA, 2003).

Existem outros dois fatores importantes para a determinação do caráter quimioprotetor de *A. brasiliensis*. A temperatura de preparo pode influenciar sua eficiência, pois quando muito elevadas são capazes de afetar os princípios ativos e, desta maneira, o cogumelo pode não se mostrar tão eficiente como deveria (DELMANTO *et al.*, 2001). O segundo fator inclui as diversas fases de desenvolvimento de *A. brasiliensis*, onde o cogumelo jovem ou fechado apresenta menor concentração de  $\beta$  – glucan, e conseqüentemente são menos aptos na quimioproteção que os mais velhos ou abertos (CELSO citado por EIRA, 2003). Este autor cita que a concentração média de  $\beta$  – glucan em quatro linhagens de *A. brasiliensis* variou de 0,398 a 0,676g de  $\beta$  – glucan/100 g de cogumelo desidratado.

## **2.2. Genotoxicidade**

A genotoxicidade é a área da genética que estuda as alterações na base genética da vida, seja ela na estrutura físico-química do DNA, processo este classificado de mutagênese, ou na alteração da determinação genética ao nível celular, classificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese. Estes três processos podem ser produzidos ao mesmo tempo, como é o caso dos provocados pela radiação gama. Porém, eles apresentam suas complexidades, exigindo serem estudados separadamente com o objetivo de conhecer melhor cada um destas áreas. Hoje em dia são bastante pesquisadas, pois se relacionam com malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular e do corpo, e o câncer. A genotoxicidade é uma especialidade relativamente recente e se situa na interface entre toxicologia e genética (SILVA *et al.*, 2003).

### **2.2.1. Mutagênese**

Quando se fala em mutações imagina-se como sendo algo negativo, o que não é correto. Se pensar em evolução, mais precisamente, nas teorias de seleção natural, tem-se uma visão diferente, porque sem mutação não haveria a variabilidade genética. Sem variabilidade genética não poderia haver seleção. Sem seleção não haveria evolução, e sem esta não há adaptação. Então, o processo de mutação é essencial para as espécies evoluírem e se adaptarem ao seu ambiente variável. A mutação ocorre de forma aleatória, causando alterações no DNA, devido a processos físicos-químicos, de ordem

molecular ou química (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

As mutações estão sempre ocorrendo em um organismo, no qual são conhecidas como as recombinações genéticas, capacidade natural do DNA de se recombinar com outras moléculas. Por elas serem realizadas naturalmente não são chamadas de mutações (SILVA *et al.*, 2003). Ao contrário destas, estão as mutações causadas por fatores exógenos ou endógenos que podem ser classificadas como gênicas, quando referem-se a mudanças de uma ou poucas sub-unidades do DNA, alterando apenas o funcionamento de um gene, por substituição, perda ou ganho destas sub-unidades. Podem ser também do tipo cromossômicas onde há reorganização dos cromossomos, por translocação, inversão, ou mesmo ganho ou perda de parte maior destes cromossomos (GHIFFITHS *et al.*, 2002).

### **2.2.2. Antimutagênese**

Antimutagênese é o processo no qual ocorre inibição das taxas de mutações nos seres vivos, e conseqüentemente a incidência de câncer (WALTERS *et al.*, 1996). Para isso, Aaron Novick e Leo Szilard, em 1952, foram os primeiros a serem relatados a respeito deste processo, onde observaram que um aumento na quantidade de adenosina podia reverter às mutações induzidas pela cafeína em bactérias (LIVIERO & VON BORSTEL, 1996). A partir desta informação, pesquisadores vêm descobrindo inúmeros agentes antimutagênicos na esperança de diminuir os índices de pacientes com câncer. Dentre os agentes antimutagênicos, Kada & Shimo (1987) propuseram duas categorias desses agentes: os desmutagênicos que promovem a alteração química ou bioquímica dos agentes mutagênicos antes que danifiquem o DNA; e os bio-antimutagênicos que suprimem o processo de fixação da mutação, após o DNA ser lesado pelo agente mutagênico.

Para a prevenção de doenças como o câncer, existe a alternativa da quimioproteção que é baseada na modulação do mecanismo de defesa, através da ingestão de alimentos e medicamentos que possuem mecanismos potenciais de prevenção ao câncer e são efetivos em modelos de estudos pré-clínicos (De FLORA *et al.*, 2001).

### **2.2.3. Mecanismos de reparo**

As células apresentam mecanismos enzimáticos, que revertem as lesões

produzidas por vários tipos de radiações, substâncias químicas e por alterações normais que ocorrem na própria célula, como erros na replicação do DNA, onde bases são alteradas ou perdidas, ligações fosfodiéster da cadeia podem ser quebradas e ligações covalentes nas fitas quando cruzadas. O reparo do DNA só é possível porque ele é formado por dupla-hélice onde são preservadas as informações genéticas, que em caso de perda destas em uma das hélices, elas serão recuperadas em outra fita. Esses mecanismos de reparos podem ser: por fotorreativação enzimática, de bases alquiladas, por excisão de bases ou nucleotídeos, com enzima de correção de erro, por recombinação pós-replicação, e por SOS (SCHRANK *et al.*, 2001; GRIFFITHS *et al.*, 2002).

#### **2.2.4. Testes de detecção de dano genético em humanos**

A maioria dos testes de detecção de danos genéticos busca agentes que possam afetar o genoma de um organismo. Devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA tem potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou microrganismo). Porém diferentes organismos possuem metabolismo, mecanismos de reparação e de detoxificação que variam consideravelmente, tornando diferente a resposta destes organismos a agentes genotóxicos. Para driblar este problema e suprir a necessidade de informações em mutagênese e carcinogênese humana foram criadas estratégias de avaliação com testes *in vitro* e *in vivo* (SILVA *et al.*, 2003).

##### **2.2.4.1. Aberrações cromossômicas**

Aberrações cromossômicas é uma técnica que indica danos ocorridos no DNA, tais como quebras e rearranjos cromossômicos (SILVA, 2001), que vem sendo utilizada em diversos tipos de células para várias finalidades, como a genética toxicológica, dosimetria biológica e em biomonitoramento, devido a sua ampla sensibilidade, pela riqueza de informações e pela sua taxa espontânea ser relativamente baixa (IAEA, 1986).

Quando ocorrem lesões induzidas por agentes clastogênicos na estrutura cromossômica, essas podem ser reparadas pelo mecanismo de reparo a fim de se restabelecer a configuração original, porém muitas vezes é comum ocorrer erro no reparo e, assim, resultando em rearranjos cromossômicos ou permanecer sem reparo,

originando uma deleção cromossômica (SILVA *et al.*, 2003). As aberrações cromossômicas podem ser induzidas em qualquer fase do ciclo celular por qualquer agente mutagênico. No entanto, dependendo do estágio do ciclo celular, diferentes tipos de aberrações podem ser produzidas: se a célula for exposta na fase G0 ou G1 do ciclo celular, a aberração resultante será do tipo cromossômica; na fase G2, do tipo cromatídica e na fase S, haverá uma mistura dos dois tipos de aberrações (CARRANO & NATARAJAN, 1987). As aberrações cromossômicas estruturais podem ser classificadas basicamente em dois tipos: instáveis e estáveis. As aberrações instáveis são representadas pelos fragmentos acêntricos, dicêntricos, *double minute*, anéis cêntricos e acêntricos, pois podem ser perdidas durante a divisão celular. As aberrações estáveis são assim chamadas, pois são tipos de alterações na estrutura cromossômica que não causam dificuldades mecânicas na divisão celular e, dessa maneira, podem se perpetuar por várias gerações. As aberrações estáveis podem ser representadas por translocações recíprocas e inversões (SILVA, 2001)

A presença de vários tipos de aberrações cromossômicas foi verificada em células tumorais, em sobreviventes de bombas nucleares (YUNIS, 1983), em abortos espontâneos decorrentes de malformações congênitas e em indivíduos expostos acidental ou ocupacionalmente a radiações (UNSCEAR, 1986; EDWARDS, 1997). Uma relação entre a presença de aberrações cromossômicas e a predisposição genética ao câncer tem sido verificada em síndromes de fragilidade cromossômica, como ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom e anemia de Fanconi (DHILLON & DHILLON, 1998).

#### **2.2.4.2. Ensaio cometa**

O ensaio cometa foi desenvolvido por Singh *et al.*, (1988), para detectar quebras simples e duplas, e sítios alcalilábeis nas moléculas de DNA, que são induzidas por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Sendo muito utilizado em estudo de genética toxicológica, a fim de um biomonitoramento ambiental ou no monitoramento populacional em humanos. Cabe salientar que este teste é utilizado como um indicativo e não é utilizado como um teste mutagênico, podendo ser utilizado tanto em células de animais quanto vegetais *in vitro* e *in vivo* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003).

O dano produzido pela radiação ionizante ou por substâncias químicas

mutagênicas no DNA das células é avaliado utilizando-se a eletroforese em gel de agarose em uma célula nucleada, sendo capaz de se visualizar o dano em células individualmente (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; TICE, 1995). O método é baseado na migração do DNA num gel de agarose exposto a um campo elétrico. As células são quebradas para remover proteínas celulares e o DNA subsequente da descompactação sob condições alcalinas (SINGH, 2000). Seguindo a descompactação do DNA ele é marcado com uma tinta fluorescente. Após a eletroforese as células (nucleóides) adquirem uma morfologia semelhante à de um cometa; onde a cabeça representa o arcabouço de DNA intacto e a cauda, fragmentos provenientes de lesões no DNA (KLAUDE *et al.*, 1996; SINGH & STEPHENS, 1996). A vantagem deste método é quanto a rapidez e simplicidade, pois a separação eletroforética é realizada em poucos minutos. Além disso, ele requer equipamentos relativamente baratos em comparação com outros métodos para identificação de materiais irradiados (COLLINS *et al.*, 1997).

### **2.3. O antitumoral doxorubicina**

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico pertencente ao grupo das antraciclinas, originalmente obtido do fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Este antitumoral é um agente inibidor da topoisomerase II, que leva à formação de quebras duplas e simples da cadeia do DNA e, conseqüentemente, à morte celular. As quebras simples podem ser convertidas para quebras duplas de cadeia durante a replicação do DNA e transcrição do RNA (SUZUKI *et al.*, 1995; KEIZER *et al.*, 1990; ROBLES *et al.*, 1999).

A DXR é conhecida comercialmente e clinicamente como andriamicina, apresentando-se como efetivo agente antineoplásico contra uma grande variedade de tumores. No entanto, seu uso clínico, freqüentemente, é limitado devido a indesejáveis efeitos colaterais especialmente a cardiotoxicidade. Quimicamente, a molécula de DXR consiste em um açúcar amino ligado a quatro anéis antraquinona cíclicos. A redução de um elétron do anel leva a formação de um radical livre semiquinona, o qual, na presença de O<sub>2</sub>, pode formar radicais superóxido (XU *et al.*, 2001).

Os efeitos genotóxicos da DXR foram extensivamente investigados em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico (BOUCHER *et al.*, 1993), em cultura de linfócitos de doadores saudáveis (VIG, 1971; ANTUNES & TAKAHASHI, 1999), em linhagens celulares de mamíferos (DIAS *et al.*, 1997; ANTUNES *et al.*, 1999) e em

experimento *in vivo*, utilizando-se células da medula óssea de ratos Wistar (ANTUNES & TAKAHASHI, 1998 e 1999). Os resultados dessas investigações mostram que a DXR é capaz de induzir aberrações cromossômicas do tipo quebras cromatídicas e isocromatídicas, “gaps” cromatídicos e isocromatídicos, rearranjos complexos como trirradiais e quadrirradiais e trocas entre cromátides irmãs. Segundo ALBERTINI *et al.* (2000), as aberrações cromossômicas resultam de quebras diretas do DNA, replicação de um DNA molde danificado e da inibição da síntese de DNA.

#### **2.4. Considerações gerais sobre câncer**

O câncer, este fenômeno, como é chamado por muitos estudiosos, é atualmente a segunda causa de mortalidade no mundo (RIBEIRO *et al.*, 2003). Devido a este lugar atingido no “ranking” de mortalidade mundial, ele vem sendo cada vez mais estudado para que um dia, cientistas consigam descobrir a fórmula capaz de retardar o desenvolvimento das células cancerosas, ou quem sabe até descobrir a cura deste fenômeno.

Câncer se caracteriza quando uma célula escapa ou ignora os controles da velocidade e da progressão do seu ciclo, ocasionando uma rápida e anormal divisão comparada com as outras células sadias. Através desta rápida proliferação, estas células cancerígenas migram para os tecidos vizinhos e, assim, se espalhando no organismo. Este crescimento desregulado é chamado neoplasia e o conjunto de células que não apresenta divisão celular igualmente ao tecido que se originou é denominado tumor. Há exceções como no caso da leucemia, câncer no sangue, que não apresentam tumores (ALBERTS *et al.*, 1997).

Os tumores podem ser classificados como benigno quando as células neoplásicas permanecem agrupadas numa massa única, facilitando o tratamento deste, através de cirurgia por remoção da massa celular. O tumor maligno é o câncer em si, onde as células cancerígenas invadem os tecidos vizinhos. Quando há invasão dessas células na corrente sanguínea ou linfática, geralmente, são formados tumores secundários, ou metástases, em outros locais do corpo (COOPER, 2001).

A relação entre sistema imunológico e as células cancerosas ocorre quando qualquer corpo estranho entra em contato com o organismo, as células de defesas são ativadas para o combate dos corpos estranhos. No caso do câncer o mecanismo de ação das células de defesas é o mesmo. A seguir são demonstradas desde a fase de

reconhecimento até a morte das células cancerígenas pelo organismo (GHONEUM *et al.*, 1995):

- a célula “natural killer” (NK) reconhece a célula cancerígena;
- as membranas da célula NK se dilatam;
- célula NK se adere à célula cancerígena;
- célula NK inicia a perfuração das células cancerígenas com a liberação dos seus grânulos e em instantes a última estará morta.

A morte da célula cancerígena ocorre devido à presença de substâncias tóxicas encontradas nos grânulos que penetraram às células. Porém, nem sempre as células NK conseguem destruir as células cancerígenas e, desta maneira, estas conseguem se proliferar no organismo. Para isto, existem três fatores que contribuem, segundo Ghoneum *et al.*, (1995):

– **Fagocitose:** com este processo a célula cancerígena tem a capacidade de destruir a célula NK por três maneiras: englobando a célula NK, formando reentrâncias em sua superfície absorvendo a célula NK, emitindo tentáculos e prendendo a célula NK.

– **Fator de Imunossupressão:** a célula cancerosa consegue imunodeprimir a célula NK diminuindo seu potencial citotóxico, através de uma proteína que adere à membrana da NK.

– **Degranulação:** a célula cancerosa degranula a célula NK, sem os grânulos esta perde seu potencial de ação.

Outro importante componente do sistema imunológico são os linfócitos que tem a capacidade de atacar as células do corpo infectadas por vírus oncogênicos (capaze de causar câncer) ou as células em transformação maligna, bem como de secretar substâncias chamadas de linfocinas. As linfocinas regulam o crescimento e o amadurecimento de outras células e do próprio sistema imune. Sem dúvida, a compreensão dos mecanismos de ação do sistema imunológico muito contribuirá para a elucidação de diversos pontos importantes no entendimento da carcinogênese e, portanto, para novas estratégias de tratamento e de prevenção do câncer (STITES *et al.*, 2000).

#### **2.4.1. Causas do câncer**

A maioria das substâncias mutagênicas são também carcinogênicas, ou seja, tem a capacidade de alterar o DNA e também de causar o câncer (LEWIS, 2004).

As causas do surgimento do câncer podem ser associadas a inúmeros fatores, externos ou internos ao organismo. Os fatores externos são aqueles relacionados ao meio ambiente, aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural, ou ainda por exposição ocupacional. Os fatores internos são genéticos, na maioria das vezes, através das mutações que estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (COOPER, 2001).

Sabe-se que a maioria dos casos de câncer está associada a fatores ambientais, sendo os principais:

- **Químico:** para os fumantes, a fumaça do cigarro é rica em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aminas aromáticas, compostos químicos que induzem a formação de tumores cancerígenos (NUSSBAUM *et al.*, 2002); dieta deficiente rica em gordura, falta de fibras, excesso de sal, bebidas quentes e alcoólicas são fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer no trato digestivo, principalmente; outras substâncias como: arsênio, benzeno, óleo diesel, formaldeído, amianto, corantes, óleos minerais, pesticidas, herbicidas, entre outros (SILVA *et al.*, 2003);

- **Físicos:** utilização de fontes radioativas como: radiações ionizantes, raios-X, luz ultravioleta e outros (SILVA *et al.*, 2003);

- **Biológicos:** incluem os agentes infecciosos como as bactérias e os vírus (SILVA *et al.*, 2003). Os hormônios como os estrógenos, também são importantes como promotores de tumor no desenvolvimento de alguns cânceres humano, como no caso do câncer uterino, onde há uma grande proliferação das células do endométrio uterino estimulada por este hormônio (COOPER, 2001).

Além destes fatores serem as causas principais do câncer, a maioria destes é capaz de induzir alterações cromossômicas, formação de micronúcleos e trocas de cromátides irmãs (SILVA *et al.*, 2003). Os casos de cânceres genéticos ou hereditários são mais raros, sendo mais comum a indução de danos genéticos por fatores ambientais. Um exemplo de doença causada por fator hereditário são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam história familiar deste tumor (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

#### **2.4.2. Genes envolvidos na carcinogênese**

Normalmente, as células cumprem um ciclo em que se multiplicam, crescem, diferenciam-se e morrem, obedecendo a um controle genético e a um sistema complexo de sinais bioquímicos.

Esse controle genético é exercido por duas classes de genes específicos: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (ALBERTS *et al.*, 1997).

Os proto-oncogenes são genes ligados às células normais que controlam os processos de proliferação e diferenciação das células. Porém, quando há modificações nesses proto-oncogenes eles podem tornar-se oncogenes. Estes últimos são responsáveis pelo descontrole da divisão celular e produzir o fenótipo maligno implantado nas células normais. A ativação dos proto-oncogenes pode ser por rearranjos cromossômicos, amplificação gênica, ou simples mutações pontuais. Já os genes supressores tumorais, como o gene p53, têm a função de regular o crescimento celular e a capacidade de suprimir a formação de um tumor. Contudo, mutações nos genes supressores podem contribuir para o desenvolvimento do câncer (SNUSTAD & SIMMONS, 2001; GRIFFITHS *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2003).

### **2.4.3. Prevenção do câncer**

A imunoterapia não age como a quimioterapia que combate diretamente as células do câncer, mas aumenta a atividade do sistema imunológico impedindo o seu desenvolvimento. Foi comprovada a ausência de efeitos colaterais de substâncias anti-câncer, como o  $\beta$ -glucano extraído de cogumelos e vegetais, mesmo quando usadas durante longos períodos (MIZUNO, 1995). A partir da elaboração de campanhas no sentido da orientação da população sobre os cuidados com o câncer, foram selecionados 12 mandamentos para evitar o câncer (MIZUNO, 1995):

- Utilizar alimentos contendo todos os nutrientes;
- Evitar repetir sempre os mesmos alimentos;
- Evitar comer em excesso;
- Evitar bebidas alcoólicas em excesso;
- Não fumar;
- Comer muitas verduras e alimentos ricos em vitaminas e fibras;
- Evitar ingerir muito sal;
- Não comer alimentos muito quentes ou partes muito queimadas;

- Não ingerir alimentos com sinais de mofo;
- Não se expor excessivamente ao sol;
- Evitar cansar-se ou ficar estressado em demasia;
- Manter a higiene corporal.

Além destes fatores ambientais que são de suma importância para a prevenção do câncer, existem produtos farmacológicos que podem funcionar como quimiopreventivos. Num sentido mais amplo, estes produtos são divididos em duas categorias principais: aqueles que previnem a iniciação do processo de carcinogênese, através do bloqueio das mutações, ou seja, utilizando agentes bloqueadores que genericamente são chamados de antimutagênicos; e aqueles que interferem sobre a promoção ou progressão das lesões que foram previamente fixadas, ou seja, agentes supressores ou anticarcinógenos (SILVA *et al.*, 2003).

Nos casos em que o câncer foi instalado, a pessoa deve passar por uma série de exames para indicar qual o tratamento mais adequado para o tipo encontrado. Este pode ser feito através da cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, transplante de medula óssea, no caso da leucemia e a imunoterapia. Cada tratamento pode ser utilizado de forma isolada ou combinada, dependendo do tipo celular do órgão de origem e do grau de invasão do tumor (INCA, 2004).

O *A. brasiliensis* é utilizado popularmente para prevenção do câncer e no tratamento como forma de imunoterapia, pois ele é capaz de estimular as células do sistema imune que estão enfraquecidas com a doença, fazendo com que o próprio organismo do doente elimine as células cancerosas (GHONEUM *et al.*, 1995).

### **3. Materiais e métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética/Faculdade de Medicina/USP, Ribeirão Preto - SP, compreendendo cultura de linfócitos de sangue periférico humano e aplicações de testes para detectar a ação do extrato do cogumelo *A. brasiliensis* no controle das alterações celulares. As análises dos resultados foram realizadas em Laboratórios do Instituto de Biologia/UFPel, sendo submetidos por último, as análises estatísticas.

#### **3.1. Culturas de linfócitos de sangue periférico humano**

As culturas de linfócitos de sangue periférico humano foram preparadas, através da coleta de sangue venoso de três pessoas do sexo feminino, com idade entre 20-30 anos, retirando-se 10mL de cada indivíduo em tubos Vacuntainer heparinizados. O sangue coletado permaneceu em repouso em local fresco e abrigado da luz para que ocorresse a sedimentação. Em seguida, a camada de plasma, juntamente com a de linfócitos, foram retiradas com movimentos circulares para obtenção de hemácias e maior concentração de linfócitos. Esta mistura foi transferida para um tubo de ensaio através do auxílio de uma pipeta pasteur, sendo esse material utilizado na semeadura das culturas.

Os linfócitos e as hemácias foram homogeneizados e aproximadamente 15 gotas foram semeadas em 5mL de meio de cultura completo (ANEXO 1), constituído por 77% de meio RPMI - 1640 (Sigma), 20% de soro bovino fetal (Culturab) e 3% de fitohemaglutinina (Gilbro). O tempo de incubação total das culturas, a 37°C, foi de 50 horas.

#### **3.2. Substâncias utilizadas**

As substâncias utilizadas foram baseadas em referências bibliográficas, na qual se utilizou uma substância mutagênica e o cogumelo *A. brasiliensis*.

##### **3.2.1. Agente mutagênico**

A substância utilizada como controle positivo foi a adriblastina, RD (cloridrato de doxorrubicina), do laboratório Eurofarma, com embalagem de 50mg de cloridrato de doxorrubicina a forma de pó liofilizado. A dose utilizada foi de 0,15µg por mL de cultura, sendo administrada uma hora após as culturas terem sido tratadas com a solução de *A. brasiliensis*.

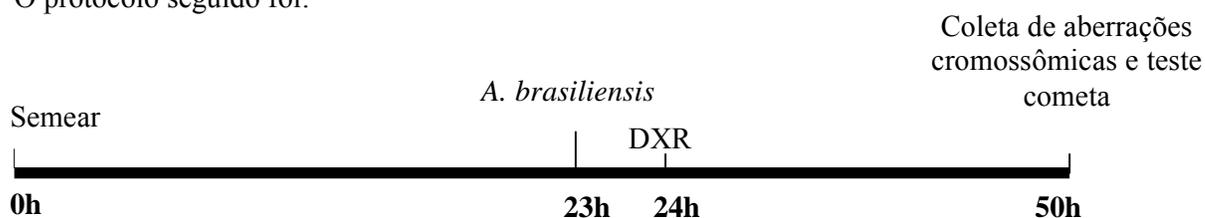
### 3.2.2. Solução de *Agaricus brasiliensis*

O cogumelo foi obtido na Faculdade de Ciências Agrônomicas/UNESP, Botucatu - SP. Os cogumelos secos foram moídos e extratos aquosos foram preparados a partir do pó (7,5g em 100mL de água esterilizada) a duas diferentes temperaturas: 4° e 25°C, com repouso de uma e duas horas, respectivamente. Após, os extratos foram submetidos a uma pré-filtragem com a utilização de papel-filtro, sendo logo em seguida filtrados em milipore. A quantidade de extrato aquoso utilizado para os pré-tratamentos foi de 100µL quando as culturas completaram 23 horas de incubação.

### 3.3. Grupos de tratamento

- Controle negativo
- Controle DXR: 0,15µg por mL de meio de cultura
- Solução de *A. brasiliensis* a 4°C
- Solução de *A. brasiliensis* a 25°C
- Solução de *A. brasiliensis* a 4° + DXR
- Solução de *A. brasiliensis* a 25° + DXR

O protocolo seguido foi:



A metodologia utilizada para avaliar o efeito antimutagênico de *A. brasiliensis*, é demonstrada esquematicamente, todas as etapas, na Figura 2.



