

Efeitos do *agaricus blazei* na clastogenicidade induzida pela radiação ultravioleta em cultura de células CHO-K1

Effects of *agaricus blazei* on clastogenicity induced by ultraviolet radiation in culture of CHO-K1 cells

Ariane Fernanda da Silva¹; Rodrigo Juliano Oliveira¹;
Renata Matuo¹; Lúcia Regina Ribeiro²; Mário Sérgio Mantovani¹

Resumo

O *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann (ABM), cogumelo comestível nativo do Brasil, tem sido utilizado na medicina popular no tratamento de inúmeras doenças, incluindo o câncer. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato ABM (0,4%) na clastogenicidade induzida pela exposição à radiação ultravioleta (UV), em culturas de células CHO-k1, pelo teste de aberração cromossômica. As células foram tratadas em diferentes condições (tratamento contínuo, pré-tratamento e pós-tratamento), associadas à indução de danos no DNA pela UV. A análise dos dados demonstrou que a UV e o ABM apresentaram atividade clastogênica. Nos protocolos de pré e pós-tratamento não foram evidenciados efeitos anticlastogênicos. No entanto, o protocolo de tratamento contínuo demonstrou efeito protetor com redução de danos de 86,1%. Os resultados não permitem inferir com clareza o tipo de mecanismo de ação do extrato de ABM, o qual poderia agir tanto por desmutagênese, quanto por bioantimutagênese. No entanto, é evidente o seu efeito na diminuição de danos causados por radiação não-ionizante, apesar de, em concentração muito elevada, apresentar atividade clastogênica.

Palavras-chave: Luz UV. Ensaio de Aberração cromossômica. *Agaricus blazei*. CHO-k1.

Abstract

The *Agaricus blazei* Murril ss. Heinemann (ABM), an edible mushroom native from Brazil, has been used in popular medicine on the treatment of several diseases, including cancer. The purpose of the present study was to evaluate the effects of the ABM extract (0.4%) on the clastogenicity induced by the exposure to ultraviolet radiation (UV), in CHO-K1 culture cells, through the chromosome aberration test. The cells were treated in different conditions (continuous treatment, pre-treatment and post-treatment) associated to DNA damage induction by UV. The analysis of the data demonstrated that the UV and the ABM present clastogenic activity. On pre and post-treatment protocols, anticlastogenic effects have not been evidenced. However, the continuous treatment protocol presented 86.1% damage reduction, a protective effect. The results do not clarify about the mechanism of action of the ABM extract, which could act either through dysmutagenesis or through bioantimutagenesis. Nevertheless it is evident its effect on the reduction of damage caused by non-ionizing radiation, in spite of presenting clastogenic activity at very high concentration.

Key words: Ultraviolet radiation (UV). Chromosome aberration test. *Agaricus blazei*. CHO-k1.

¹ Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral (CCB). E-mail: biomsm@uel.br.

² UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Introdução

Diferentes organismos, inclusive o homem, estão expostos a vários fatores químicos e físicos que podem causar danos ao material genético. Estes, por sua vez, podem passar pelos mecanismos de reparo das células sem ser reparados e constituir as mutações. Os efeitos das mutações sobre os fenótipos dos organismos vivos variam desde alterações pequenas até letais e a maioria das mutações exerce seus efeitos no fenótipo por meio da alteração das seqüências de aminoácidos dos polipeptídeos. Esses polipeptídeos mutantes causam bloqueio nas vias metabólicas e podem gerar diversas doenças (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). Devido a este fato, vários estudiosos têm-se dedicado a pesquisas que tentam solucionar questões decorrentes de problemas de saúde.

A radiação ultravioleta é uma constante preocupação da classe médica devido à crescente incidência de cânceres de pele. Tal radiação é do tipo não-ionizante e exerce seus efeitos por dissipar energia para átomos que encontra, o que eleva os elétrons para órbitas mais externas e gera um estado chamado de excitação. As moléculas que têm átomos nas formas iônicas ou nos estados excitados são quimicamente mais reativas que aquelas que contêm átomos em seus estados estáveis normais. Assim, sabe-se que a reatividade aumentada dos átomos presentes nas moléculas de DNA é a responsável pela mutagenicidade apresentada por este tipo de radiação, que pode levar ao desenvolvimento de câncer (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; LEWIN, 2001).

Muitas substâncias com efeitos protetores são encontradas em dietas ricas em verduras, frutas, legumes e fibras, principalmente. Estudos epidemiológicos e experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstram que existe uma associação inversamente proporcional entre o consumo de frutas e verduras ricas em ácido ascórbico, fitoestrógenos e carotenóides (agentes antioxidantes), por exemplo, e o risco de desenvolvimento de cânceres e outras patologias crônicas (FLAGG; COATES;

GREENBERG, 1995; WEISBURGER, 1999; ZHANG et al., 1999; WEISBURGER, 2000; FERRARI, 2001; FERRARI; TORRES, 2002).

Um dos possíveis componentes das dietas anteriormente mencionadas são os cogumelos. O *Agaricus blazei* é nativo do Brasil e freqüentemente consumido na alimentação, na forma de chás e em cápsulas, na medicina popular, em diferentes partes do mundo. Nesse enfoque, o *A. blazei* tem sido utilizado no combate ao estresse físico e emocional, estimulação do sistema imunológico, redução do colesterol, combate à osteoporose e à úlcera, redução de problemas circulatórios e digestórios (BELLINI, 2005), e auxílio à qualidade de vida em diabéticos, uma vez que tem sido demonstrada sua atividade anti-hiperglicêmica e anti-hipertrigliceridêmica (KIM et al., 2005). Cientificamente, ele tem sido testado quanto às propriedades antioxidantes, incluindo possível atividade antitumoral (KAWAGISHI et al., 1988; MIZUNO, 1995; TAKUSABURO; YOSHIKY, 1998), efeitos anticancerígenos (TAKEDA, 2000), antimutagênico e anticlastogênico (DELMANTO et al., 2001; MENOLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BELLINI et al., 2003; LUIZ et al., 2003a; LUIZ et al., 2003b).

A eficácia dos extratos do *Agaricus blazei* na antigenotoxicidade encontra-se bem descrita na literatura pertinente frente a agentes químicos. No entanto, estudos acerca dos efeitos desse mesmo cogumelo em danos induzidos por agentes físicos ainda constituem uma lacuna. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos antimutagênicos do *Agaricus blazei*, por meio de extratos obtidos a partir de seu basidiocarpo em pó, na clastogenicidade induzida pela exposição à radiação ultravioleta em cultura de células CHO-k1.

Materiais e Métodos

Preparação dos extratos aquosos

Os extratos foram preparados a partir das amostras de basidiocarpo desidratado e moído do

ABM, obtidos do Módulo de Cogumelos do Departamento de Agronomia da UNESP, Botucatu, SP (Brasil). Prepararam-se os extratos na concentração 10%, diluindo-se 10g do pó do cogumelo em 100mL de água deionizada, a 25°C, com agitação constante por duas horas. Filtrou-se então a solução em papel de filtro comum e, em seguida, em membrana de esterilização 0,22 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ de poro.

Linhagem celular e condições de cultura

A linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) do tipo selvagem (K_1) foi obtida do Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), por meio da Profa. Dra. Catarina S. Takahashi. As células foram cultivadas em frascos de cultura descartáveis (25cm²), na forma de monocamada, em meio de cultura DMEM-F12 (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL) a 37°C em estufa do tipo BOD. Nessas condições, o ciclo celular considerado é de 12 horas.

Agente indutor de danos

Para obtenção de aberrações cromossômicas, foi utilizada a luz UV existente dentro da cabine do fluxo laminar, em tempo de exposição igual a 5 segundos, correspondendo à intensidade luminosa de 20mW/cm².

Aberração cromossômica

Os tratamentos realizados foram: a. controle; b. exposição à UV; c. extrato aquoso ABM (0,4%); d. ABM pré-tratamento + UV; e. ABM tratamento contínuo + UV; f. UV + ABM pós-tratamento. Para o tratamento-controle, as células foram cultivadas por dois ciclos celulares completos, lavadas com PBS e tripsinizadas, permanecendo em cultura por mais 15 horas. O tratamento com ABM, para análise da mutagenicidade, deu-se por 27h. Nos protocolos de

antimutagenicidade fez-se o pré-tratamento, no qual as células passaram por um ciclo completo e, em seguida, acrescentou-se o ABM ao meio de cultura por 12h. Depois lavou-se as células com PBS, tripsinizou-se e fez-se a exposição à UV, permanecendo as culturas em estufa por mais 15 horas. Para o tratamento contínuo procedeu-se da mesma forma que a anterior: o ABM também estava presente durante a exposição e continuou em cultura por mais 15 horas após a exposição. Para o pós-tratamento lavaram-se e tripsinizaram-se as células, fez-se a exposição e o ABM foi adicionado nas últimas 15 horas de cultura. Todas as culturas receberam o colcemide (Demecolcine, Sigma – 10,0mg/ml) nos últimos 90 minutos. As células foram tripsinizadas (0,025%) e posteriormente hipotonizadas em solução de citrato de sódio (1%), a 37°C, por 20 minutos. As células em suspensão, a seguir, foram fixadas em metanol/ácido-acético (3:1) e as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 5 minutos.

Análise de lâminas e estatística

Cem metáfases foram analisadas por cultura, num total de 300 células por tratamento, e as três repetições foram realizadas independentemente. As aberrações cromossômicas foram classificadas como isocromatídicas (i.e. quebras isocromatídicas – ic; dicêntrico – dic; e anel – r) ou cromatídicas (quebras cromatídicas – ct; trirradial – tr, quadrirradial – qr e rearranjo complexo – rc) (BRUSICK, 1987; BEZ et al., 2001). Metáfases com mais de 10 aberrações cromossômicas foram classificadas como aberrações múltiplas (ma). A porcentagem de redução das aberrações cromossômicas (WATERS et al., 1990) foi calculada por meio da razão entre número de células com aberrações encontradas no controle positivo menos o número de células com aberrações encontradas nos tratamentos de anticlastogenicidade x 100, pelo número de células com aberrações encontradas no controle positivo menos o número de células com aberrações encontradas no controle negativo. O índice mitótico foi calculado pela relação entre o número de células em divisão x 100 sobre o

número de células analisadas. A análise estatística do número de células com aberrações cromossômicas foi realizada com o teste do Q-quadrado ($p < 0,05$). A análise dos índices mitóticos foi realizada pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Resultados

O número e os tipos de aberrações cromossômicas observados nos protocolos de clastogenicidade e anticlastogenicidade dos extratos de *Agaricus blazei*

e/ou UV estão apresentados na Tabela 01. A análise estatística desses resultados permitiu verificar que a UV foi eficiente em induzir danos, em uma alta proporção, e o extrato de ABM também se mostrou clastogênico, porém com menor frequência de danos.

Os protocolos de anticlastogenicidade demonstraram que não houve eficiência no pré e no pós-tratamento. Já o protocolo de tratamento contínuo mostrou uma alta redução de danos, cerca de 86,1%, a qual foi estatisticamente significativa (Tabela 02).

Tabela 01. Avaliação da clastogenicidade e anticlastogenicidade do extrato de *Agaricus blazei* frente à ação da radiação UV, em 300 metáfases de células CHO-k1, submetidas aos diferentes protocolos.

Protocolo	Tratamento	Total de Metáfases com Aberração	Total de Aberrações	Aberrações por célula	Tipos de Aberrações								Gaps		AM
					dic	ic	ct	qd	tr	rc	anel	fa	ic	ct	
Clastogenicidade															
	Controle	13	14	1,08	3	1	2	0	0	1	1	0	5	1	0
	UV	49 ^{a*}	51	1,04	13	4	12	0	0	9	1	0	7	5	2
	ABM	29 ^{a*}	30	1,03	7	2	3	0	0	5	2	0	11	0	0
Anticlastogenicidade															
Pré-Tratamento	ABM + UV	38 ^b	50	1,32	6	6	8	1	0	14	2	0	6	7	3
Contínuo	ABM + UV	18 ^{b*}	20	1,11	5	1	3	0	0	5	2	0	2	2	0
Pós-Tratamento	ABM + UV	49 ^b	59	1,20	4	6	17	2	0	18	2	0	7	3	0

^a Comparado estatisticamente com o Controle; ^b comparado estatisticamente com UV; * $p < 0,05$ (Teste: Qui-quadrado).

Tabela 02. Média e desvio padrão da frequência de aberrações cromossômicas, porcentagem de danos e redução dos mesmos e índice mitótico nos diferentes protocolos de clastogenicidade e anticlastogenicidade do extrato de *Agaricus blazei* frente à ação da radiação UV

Protocolo	Tratamento	Células com Aberrações				Índice Mitótico (%)
		Média	Desvio Padrão	Porcentagem de Danos	Porcentagem de Redução de Danos	
Clastogenicidade						
	Controle	4,33	0,58	4,00	-	11,9
	UV	16,33	5,13	16,3	-	6,90
	ABM	9,67	3,05	9,67	-	5,02
Anticlastogenicidade						
Pré-Tratamento	ABM + UV	12,67	8,96	12,7	30,5	10,6
Contínuo	ABM + UV	6,00	2,65	6,00	86,1	7,39
Pós-Tratamento	ABM + UV	16,33	3,51	16,33	0,00	5,00

Comparado estatisticamente com o Controle; * $p < 0,05$ (Teste: Qui-quadrado).

Os resultados observados não permitem inferir o mecanismo de ação deste extrato, visto que o protocolo de tratamento contínuo demonstra uma atividade tanto desmutagênica quanto bioantimutagênica.

A Tabela 02 apresenta os dados referentes ao índice mitótico, que variou de 5,0% na associação do ABM e UV em pós-tratamento a 11,9% no controle, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

Discussão

Diferentes produtos naturais têm sido utilizados cada vez mais na medicina popular, já que a população, em geral, acredita que estes possuam poucos ou quase nenhum efeito adverso. No entanto, muitos desses produtos não possuem estudos de seu potencial benéfico e/ou curativo.

Este trabalho se propôs a avaliar a atividade do extrato aquoso de ABM frente aos danos causados por radiação não-ionizante. Sabe-se que radiação ultravioleta não possui energia suficiente para induzir ionização. Entretanto, ela é prontamente absorvida por muitas moléculas orgânicas, tais como purinas e pirimidinas. Os raios UV penetram muito pouco nos tecidos animais. Assim, nos organismos multicelulares, apenas as camadas de células epidérmicas, em geral, estão expostas aos efeitos destes raios. Entretanto, a luz ultravioleta é um potente mutágeno para organismos unicelulares (SNUSTAD; SIMMONS, 2001) e para células em cultura em sistema de monocamada.

Estudos *in vitro* mostraram que as pirimidinas absorvem fortemente em 254 nm e, como resultado, tornam-se muito reativas. Dois produtos principais de absorção de UV pelas pirimidinas são os hidratos de pirimidina e os dímeros de pirimidina. Várias linhas de evidência indicam que a dimerização da timina é provavelmente o principal efeito mutagênico da UV. Os dímeros de timina causam mutações de dois modos: (1) perturbam a estrutura das duplas hélices de DNA e interferem na precisão da duplicação do DNA; (2) os erros ocorrem durante os processos celulares que reparam os defeitos do DNA (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Nesta pesquisa, mostrou-se a eficiência do extrato de ABM, no protocolo de tratamento contínuo, em reduzir os danos clastogênicos advindos da exposição à UV. Este fator de prevenção apresentou-se de forma muito significativa, visto que promoveu uma redução de cerca de 86,1%. O protocolo de pré-tratamento apresentou redução de danos, porém não de forma estatisticamente significativa, mas indicando

uma pequena atividade. Já no protocolo de pós-tratamento não foi verificado nenhum indício de eficácia.

Existem basicamente duas classes de substâncias protetoras do DNA, as de mecanismo desmutagênico e as de bioantimutagênico (KADA, 1981). Substâncias desmutagênicas são aquelas capazes de impedir a ação dos agentes indutores de danos, principalmente por adsorção dos mesmos, de modo que sua atuação ocorra preferencialmente no meio extracelular. Já os agentes bioantimutagênicos são aqueles capazes de prevenir a lesão ou de reparar o DNA, agindo no interior da célula. (KADA; SHIMOI, 1987). De Flora (1998) ainda diz que as substâncias bioantimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA: elas estimulam o reparo livre de erro em danos no DNA; ou inibem os sistemas de reparo sujeitos a erro. No entanto, relatos a respeito destas atividades frente a agentes físicos não foram encontrados na literatura pertinente.

Estudos com agentes químicos indicam que protocolo de tratamento contínuo pode indicar tanto atividade desmutagênica quanto bioantimutagênica. Assim, os dois protocolos de pré e pós-tratamento seriam necessários para auxiliar na diferenciação destes dois tipos de mecanismos.

De acordo com esses dados, seria possível supor uma atividade desmutagênica para o extrato, visto que ele apresentou eficiência estatisticamente significativa no protocolo de tratamento contínuo. No entanto, a hipótese de mecanismo de ação por bioantimutagênese é de menor eficiência, uma vez que o protocolo de pós-tratamento não demonstrou prevenção e esta foi reduzida no protocolo de pré-tratamento, quando comparada ao tratamento contínuo.

Segundo Snustad e Simmons (2001), os mecanismos de reparo do DNA em danos causados por UV, dímeros de timina, em mamíferos, ocorrem de duas formas. O primeiro mecanismo é o reparo por excisão de nucleotídeos, o qual remove lesões maiores, como dímeros de timina e bases com grandes

grupos laterais do DNA. No reparo por excisão de nucleotídeos, a atividade de uma única nuclease, excinuclease, produz cortes em ambas as fitas danificadas e excisa o oligonucleotídeo contendo os danos (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Estudos demonstram que, em *E. coli*, a atividade de excinuclease envolve produtos de 3 genes, *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*. Em humanos e outros mamíferos o reparo por excisão ocorre através de uma via semelhante a da *E. coli*, mas envolve cerca de quatro vezes mais proteínas (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; LEWIN, 2001).

O segundo mecanismo é o reparo pós-replicação, que somente se manifesta quando o anterior não está ativo devido a mutações nos genes já referidos, família *uvr*. Nesse caso, quando a DNA polimerase III encontra um dímero de timina em um filamento molde, seu progresso é bloqueado. A DNA polimerase reinicia a síntese de DNA em alguma posição *upstream*, deixando um espaço no filamento nascente oposto ao dímero no filamento molde. Nesse ponto, a seqüência original de nucleotídeos foi perdida de ambos os filamentos desta dupla hélice prole. Mas a molécula danificada é reparada por um processo de reparo dependente de recombinação mediado pelo produto do gene *recA* de *E. coli* (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

A proteína RecA, que é necessária para a recombinação homóloga, estimula a troca de filamentos únicos entre as duplas hélices homólogas. Durante o reparo de pós-replicação, a proteína RecA se liga ao filamento único de DNA no espaço e medeia o pareamento com o segmento homólogo da dupla hélice irmã. O espaço oposto ao dímero é preenchido com o filamento homólogo de DNA da molécula de DNA irmã. O espaço resultante na dupla hélice irmã é preenchido pela DNA polimerase, e o corte é selado pela DNA ligase. O dímero de timina permanece no filamento molde da molécula de DNA prole original, mas o filamento complementar agora está intacto. Se o dímero de timina não é removido pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeo,

este reparo pós-replicação deve ser repetido após cada rodada de replicação de DNA (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Assim, caso seja excluída a hipótese de bioantimutagênese, pode-se inferir que as células CHO-k1 não possuem nenhum destes dois tipos de reparos ativos. Uma possibilidade para este fato seria que os genes das famílias *uvr* ou *rec* estivessem mutados. Para tal afirmação, porém, seria interessante fazer-se a avaliação do padrão de expressão de proteínas destas células submetidas aos protocolos descritos, e o seqüenciamento dos polipeptídeos para a confirmação das mutações.

Estudos que relacionam mecanismo de ação de agentes anticlastogênicos na indução de danos por indutores físicos ainda são recentes. Mas algumas hipóteses podem ser aventadas: (1) a substância em testes, extrato aquoso de ABM, poderia formar uma capa protetora ao redor das moléculas de DNA. Como as radiações não-ionizantes possuem baixa capacidade penetrante, os raios ultravioleta, por exemplo, não teriam energia suficiente para atravessar esta barreira, o que impediria a excitação dos elétrons nas camadas mais externas dos átomos constituintes das bases nitrogenadas; (2) outra possibilidade seria que, mesmo excitados, os elétrons não conseguiriam passar para a eletrosfera de outros átomos, e assim as bases nitrogenadas estariam menos reativas e, portanto, menos propensas a formar os dímeros de timina; (3) uma terceira hipótese a elencar é a seguinte: os elétrons, estando excitados e conseguindo saltar por diferentes eletrosferas, além de dímeros de timina, poderiam propiciar a formação de radicais livres, visto que estes elétrons saltariam para átomos e ou moléculas que não os componentes da molécula de DNA. Assim, por exemplo, moléculas de água que estão presentes no meio intracelular poderiam ser ionizadas formando as hidroxilas, que são também agentes muito reativos e capazes de causar danos ao genoma em estudo. Dessa forma, novos danos poderiam ser estabelecidos ou ainda esta nova proporção poderia intensificar os danos já descritos especificamente para exposição à UV, os

dímeros de timina. Caso esta última possibilidade fosse verificada, há relatos na literatura de que possíveis fracionamentos do extrato de ABM possuem substâncias com importantes atividades antioxidantes descritas, como é o caso do ácido linoleico, vitamina D e a b-glucana. Apesar de não haver na literatura nenhum trabalho que fundamente essas hipóteses, é pertinente supor que estes mecanismos anticlastogênicos possam ocorrer. No entanto, novos trabalhos são necessários para comprová-los.

Segundo Mizuno (1995), o corpo de frutificação do *Agaricus blazei* contém 85% a 87% de água. Desidratado, este cogumelo é rico em proteínas (40 a 45%), carboidratos (38 a 45%), fibras (6 a 8%), resíduos totais (5 a 7%), lipídeos (3 a 4%) e vitaminas (em mg%) como: 0,3mg de B1, 3,2mg de B2, 49,2mg de niacina. Ele também contém uma quantidade relativamente grande de ergosterol (0,1 a 0,2%), o qual é convertido em vitamina D2 via pré-vitamina D2, após a exposição à luz e ao cozimento. O principal componente mineral do *A. blazei* é o potássio (K), com 2,97%. Os estudos de Osaki et al. (1994) testaram os efeitos antimutagênicos dos compostos de *A. blazei*, demonstrando a presença do ácido linoléico como a principal substância antimutagênica. Kawagishi et al. (1988) foram os precursores no fracionamento dos compostos encontrados no corpo de frutificação de *A. blazei*. Os autores detectaram polissacarídeos com atividade antitumoral, dentre eles o de maior fração foi FIII-2-b, que é compreendido de um complexo de proteína, a (1→(6)-β-D-glucan, composto de 43,3% de proteína e 50,2% de hidratos de carbono.

Assim, é possível que estes compostos, presentes no ABM, atuem na prevenção dos danos induzidos pela radiação ultravioleta quelando, por exemplo, os radicais livres formados. No entanto, novos estudos são necessários para compreender-se o mecanismo de ação do *Agaricus blazei* na clastogenicidade induzida pela UV.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

- BELLINI, M. F.; GIACOMINI, N. L.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in Vitro*, Oxford, v.17, n.4, p.465-469, 2003.
- BELLINI, M.F. *Efeito de extratos aquosos e orgânicos de Agaricus blazei no teste de aberração cromossômica e interferência da metabolização no teste do micronúcleo e cometa, in vitro*. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- BEZ, G. C.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E. P.; MANTOVANI, M. S. Differential protection of A and B chlorophyll in MMC – mediated induction of chromatid and isochromatid breaks in human lymphocytes culture. *Cytologia*, Tokyo, v.66, p. 313-318, 2001.
- BRUSICK, D. J. *Principles of genetic toxicology*. 2. ed. New York: Plenum Press, 1987.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of mutagenesis*, Amsterdam, v.402, n.1/2, p. 151-158, 1998.
- DELMANTO, R. D.; DE LIMA, P. L. A.; SUGUIA, M. M.; SALVADORI, D. M. F.; DA EIRA, A. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation research-genetic toxicology and environmental mutagenesis*, Amsterdam, v.20, n.1/2, p.15-21, 2001.
- FERRARI, C. K. B. Oxidative stress pathophysiology searching for an effective antioxidant protection. *Journal of International Medical Research*, Northampton, v.8, p.175-184, 2001.
- FERRARI, C. K. B.; TORRES, E.A.F.S. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v.48, n.3, p.375-382, 2002.
- FLAGG, E. W.; COATES, R. J.; GREENBERG, R. S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v.14, n.5, p.419-427, 1995.

- KADA, T. Environmental desmutagens and antidesmutagens. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, New Delhi, v.18, n.4, p.5-6, 1981
- KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bioantimutagens: Their modes of action. *Bioessays*, Cambridge, v.7, n.3, p.113-115, 1987.
- KAWAGISHI, H.; KATSUMI, R.; SAZAWA, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus Blazei*. *Phytochemistry*, New York, v.27, n.9, p.2777-2779, 1988.
- KIM, Y. W.; KIM, K. H.; CHOI, H. J.; LEE, D. S. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus Blazei*. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.27, n.7, p.483-487, 2005.
- LEWIN, B. *Genes VII*. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- LUIZ, R. C.; JORDÃO, B. Q.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Mechanism of clastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Amsterdam, v.528, n.1/2, p.75-79, 2003a.
- LUIZ, R. C.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Non-mutagenic or genotoxic effects of medicinal aqueous extracts from the *Agaricus blazei* mushroom in V79 cells. *Cytologia*, Tokyo, v.68, p.1-6, 2003b.
- MENOLI, R. C. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutation research-genetic toxicology and environmental mutagenesis*, Amsterdam, v.496, n.1/2, p.5-13, 2001.
- MIZUNO, T. K. *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects. *Food Reviews International*, v.11, p.167-172, 1995.
- OLIVEIRA, J. M.; JORDÃO, B. Q.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.40, p.1775-1780, 2002.
- OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericid substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus Blazei*. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, Tokyo, v.114, n.5, p.342-350, 1994.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. *Fundamentos de genética*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- TAKEDA, Y. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Carlton, v.15, n.9, p.1079-1086, 2000.
- TAKUSABURO, E.; YOSHIKI, F. Antitumor effect of peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy*, Dordrecht, v.11, n.4, p.259-265, 1998.
- WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*, v.238, n.1, p.57-85, 1990.
- WEISBURGER, J. H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.37, n. 9/10, p.943-948, 1999.
- WEISBURGER, J. H. Eat to live, not live to eat. *Nutrition*, New York, v.16, n.9, p.767-773, 2000.
- ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G. A.; MANSON, J. E.; HANKISON, S. E.; WILLETT, W. C. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v.91, n.6, p.547-556, 1999.

NORMAS EDITORIAIS PARA PUBLICAÇÃO NA SEMINA

A revista SEMINA, dividida em quatro áreas: Ciências Agrárias; Ciências Biológicas e da Saúde; Ciências Sociais e Humanas e Ciências Exatas e Tecnológicas; com periodicidade semestral é uma publicação de divulgação científica e cultural da Universidade Estadual de Londrina. Tem como objetivo, publicar artigos de pesquisa; comunicações; revisões; divulgações; resenhas de livros e revistas; resumos de teses, dissertações e/ou monografias das áreas acima citadas.

Apresentação dos Trabalhos

1 Os originais devem ser enviados, de preferência, em disquete, acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O disquete (3 ½) será aceito se o trabalho estiver, de preferência, no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Arial, tamanho 10, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2 Categorias dos Trabalhos

- a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;
- b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;
- c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e
- d) resumos de teses, dissertações e/ou monografias até 2 páginas.

3 Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPEs.

3.1 *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2 Nome(s) completo(s) do(s) autor(es). Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3 *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4 *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5 *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6 *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7 *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8 *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9 As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10 *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11 *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4 O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.

5 A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica da Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.

6 Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar.

7 Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.

8 As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

9 Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Edição da SEMINA
Campus Universitário – Caixa Postal 6001
86051-990 – Londrina, Paraná, Brasil.

Contatos: Fone (43) 3371-4449 /3 371-4105