



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HEVENILTON J. MATIAZI

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE GLUCANAS
INSOLÚVEIS DA PAREDE CELULAR DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE*, SUA AÇÃO HIPOCOLESTEROLÊMICA E OS
EFEITOS NA CLASTOGENICIDADE E
TERATOGENICIDADE CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO
AGUDA À CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

HEVENILTON J. MATIAZI

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE GLUCANAS
INSOLÚVEIS DA PAREDE CELULAR DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE*, SUA AÇÃO HIPOCOLESTEROLÊMICA E OS
EFEITOS NA CLASTOGENICIDADE E
TERATOGENICIDADE CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO
AGUDA À CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina como parte dos Requisitos necessários para a Obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Dr. Raúl J. H. Castro Gómez

Londrina
2006

HEVENILTON J. MATIAZI

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE GLUCANAS
INSOLÚVEIS DA PAREDE CELULAR DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE*, SUA AÇÃO HIPOCOLESTEROLÊMICA E OS
EFEITOS NA CLASTOGENICIDADE E
TERATOGENICIDADE CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO
AGUDA À CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl J. H. Castro Gómez

Londrina, ____ de _____ de 2006.

DEDICO,

Aos maiores amores de minha vida,

Renata e Anna Clara.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez pela orientação e amizade.

Aos Professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina pelo incentivo e atenção dispensada para minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos pelo apoio, paciência e colaboração.

A Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade oferecida.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos colegas de curso de Mestrado e Doutorado pela amizade, incentivo e colaboração.

E a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram para a concretização do doutorado realizado.

MATIAZI, Hevenilton J. **Otimização da Extração de Glucanas Insolúveis da Parede Celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sua Ação Hipocolesterolêmica e os Efeitos na Clastogenicidade e Teratogenicidade Causadas pela Exposição Aguda à Ciclofosfamida em Camundongos.** 2006. 114f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RESUMO

As glucanas têm se destacado entre os ingredientes de interesse para a indústria de alimentos, que atualmente desenvolve alimentos funcionais e para a indústria farmacêutica, por sua ação hipocolesterolêmica e hipoglicêmica e sua capacidade de aumentar a resistência imunológica e ação anti-mutagênica. A otimização da extração das glucanas insolúveis, da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, provenientes do descarte das indústrias sucroalcooleira e de cervejarias, foi realizada através de um processo viável e de baixo custo. Os parâmetros encontrados, temperatura entre 60 - 78°C; pH entre 9,7 e 10,5 em um período de tempo compreendido de 4,5 a 6,0 horas foram delimitados através do uso da metodologia de superfície de resposta. A confirmação da extração das glucanas foi realizada através da análise de ¹³C Ressonância Magnética Nuclear onde pôde ser confirmada a presença de (1,3) β -D-glucana e (1,6) β - D-Glucana com uma pureza de 87,6%. O segundo trabalho foi realizado para verificar a influência da adição de 10 % de beta glucanas a uma dieta hipercolesterolêmica (10 % de gordura de coco) em ratos Wistar. Verificou - se que houve diferença significativa para a ração com complemento de 10% de gordura de coco, mostrando que este tratamento realmente causou aumento nos níveis de colesterol sanguíneo. Verificou – se também que a beta glucana tende a diminuir o colesterol basal dos animais (tendência de redução). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a ração comercial e beta glucana e gordura de coco, e isto indica que a beta glucana é capaz de reduzir , ou evitar o aumento de colesterol induzido pela gordura. Assim, a β - glucana é capaz de reduzir a níveis semelhantes ao do controle o colesterol de animais com dietas hipercolesterolêmica. Essa resultado confirma as expectativas de que a β - glucana pode abaixar significativamente os níveis séricos de colesterol em ratos submetidos a dietas supostamente hipercolesterolêmica, como se tem observado para outros tipos de fibras solúveis. Neste trabalho foi verificado que a ação da β - glucana realmente mantém, ou impede um aumento de colesterol total sanguíneo não influenciando no consumo de ração . No terceiro trabalho utilizou –se a β-glucana solúvel para avaliar a eficiência na prevenção de danos clastogênicos, mutagênicos e teratogênicos, pois alterações que podem levar ao desenvolvimento do câncer podem também estar relacionadas ao desenvolvimento adverso da prole de animais experimentais. Foram avaliados neste trabalho, dois lotes de fêmeas, prenhes e não prenhes. A análise dos resultados indicou que a β-glucana foi eficiente em prevenir danos clastogênicos tanto em fêmeas prenhes como nas não prenhes. Demonstrou ainda que as fêmeas grávidas parecem ser mais susceptíveis ao danos mutagênicos. No entanto, os efeitos teratogênicos não foram prevenidos de forma eficiente, mas uma tendência à redução da taxa de malformações foi evidenciada. Outro resultado importante foi que apesar da β-glucana não ter prevenido as malformações ela mostrou-se muito eficiente no aumento da viabilidade fetal e redução das taxas de perda pós-implantacional e reabsorção demonstrando assim uma melhora do desempenho reprodutivo das fêmeas. No entanto, verifica-se que a β-glucana possui baixo potencial na prevenção de malformações, mas é uma forte candidata a ser utilizada na prevenção de danos genéticos e como adjuvante nas quimioterapias às quais pacientes oncológicos são submetidos.

Palavras-chave: Fermentação. *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiologia industrial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVO	08
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
3.1 COMPONENTE DA PAREDE CELULAR	09
3.1.1 Aplicações de Leveduras e seus Componentes	10
3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS	12
3.3 CARACTERÍSTICAS DAS ATIVIDADES DA β -GLUCANA.....	15
3.4 ASPECTOS DA ANTIMUTAGENICIDADE	19
3.5 ASPECTOS DA MUTAGÊNESE	21
3.6 CULTURA DE CÉLULAS	22
3.7 ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....	24
3.8 ENSAIOS DE COMETA.....	25
ARTIGO 1	27
Otimização da Extração de Glucanas da Parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
ARTIGO 2	41
Ação hipocolesterolêmica de Beta glucanas extraídas da Parede celular de <i>Saccharomyces.cerevisiae</i>	42
ARTIGO 3	52
Efeitos da Beta glucana na clastogenicidade e teratogenicidade causadas pela exposição aguda à ciclofosfamida em camundongos.....	53
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

O Brasil produz atualmente uma grande quantidade de biomassa de levedura, como subproduto e até mesmo como resíduos das indústrias de cerveja e de açúcar e álcool. O setor de álcool está em plena expansão e a produção anual irá passar de 400 mil toneladas. [9]

Tradicionalmente a levedura tem sido usada na indústria de alimentos, como agente de fermentação, na fabricação de pães, cervejas e vinhos e na forma inativa, como suplemento nutritivo em produtos naturais, além do uso como matéria prima para produção de autolisados e extratos de levedura. [9]

Mais recentemente tem havido um interesse bastante grande por parte dos pesquisadores no isolamento e na purificação de componentes importantes da levedura, com vista a usos específicos, na formulação de produtos com propriedades funcionais diferenciadas.

As beta glucanas presentes na parede da levedura, vêm causando um grande interesse na área médica por suas ações como agente anti-oxidante, pela capacidade de aumentar a resistência do sistema imunológico no tratamento de certos tumores malignos e em infecções causada por algumas bactérias e vírus. Por outro lado, a indústria de cosméticos tem utilizado beta glucanas na formulação de pomadas, aproveitando sua capacidade antiinflamatória e de diminuição de irritações na pele. [140]

Na industria de alimentos as betas glucanas têm sido usadas na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos, destacando sua utilização no desenvolvimento de produtos com alto teor de fibras alimentares, em produtos extrusados para melhorar texturas e como espessantes e estabilizantes não calóricos em sorvetes e cremes, aproveitando sua capacidade de formar gel. [140].

2 OBJETIVOS

Este trabalho consta de três partes : Na primeira parte os objetivos foram de otimizar a extração de beta glucanas da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* determinando os parâmetros, tempo, temperatura e pH. Na segunda parte do trabalho foi verificada a influência do complemento em ração de beta glucana (10%) e de gordura de coco (10%) no consumo inicial, final, peso final e colesterol total sanguíneo em ratos da linhagem Wistar, verificando assim sua ação hipocolesterolêmica. Na terceira parte do trabalho foi avaliada a eficiência deste polímero de açúcar (Beta glucana) no controle de danos clastogênicos, mutagênicos e teratogênicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPONENTES DA PAREDE CELULAR

A parede celular das leveduras é bastante espessa, cerca de 70 nm, o que corresponde à cerca de 10 vezes a espessura da membrana plasmática. [54] atribui – se à parede celular uma espessura de 100-200 nm. Esta parede não apenas serve de proteção e estrutura, como também é metabolicamente importante.

Existe muita discrepância sobre a parede celular da levedura. Alguns autores relatam que representa cerca de 14-15% da massa celular total [61], 15 – 25 % segundo Padua et al.[129], cerca de 25% até 30% [54]. É constituída por aproximadamente 40% de β - glucanas, 40% de α - mananas, 8% de proteínas, 7% de lipídios, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina [44]).

Quando a parede celular é tratada com álcali fraco ou enzimas são obtidas frações macromoleculares e fragmentos da parede celular. No caso de hidrólise com ácidos fortes, são obtidas glucose, manose, glucosamina, aminoácidos, fosfatos e lipídios [52].

Os polissacarídeos da parede celular da levedura são constituídos de unidades de glucose e manose na proporção é 2:1. [22].

De acordo com dados da literatura, a parede celular de levedura é formada principalmente por β -glucanas quitinas e mananas, associadas a glicoproteínas [9, 36, 52, 122].

O termo glucana é usado para se referir a preparações comerciais da parede celular de leveduras ou outros fungos. A parede celular de leveduras é composta predominantemente de polímeros de glucanas, mananas e quitina. Estes três componentes formam mais de 80% da matéria seca da parede celular da levedura. A β -glucana é um homopolímero de glucose com ligações glicosídicas $\beta(1-3)$, (1-4) e (1-6). Essas glucanas são solúveis em alcali e são responsáveis por 15-20% (p/p) dos componentes estruturais da parede celular [140].

A parede celular tem um importante papel na manutenção da forma estrutural da célula. Nas *Saccharomyces cerevisiae*, o maior componente filamentoso da parede celular, e que é responsável pela rigidez, é o (1,3)-beta glucana, e este composto é sintetizado pela (1,3)-beta glucano sintase, localizada na membrana plasmática [46].

A (1,6)-beta-glucana é um dos componentes da parede celular de leveduras que está interligada com proteínas, (1,3)-beta glucana e quitina. A síntese de (1,6)-beta-glucana começa no retículo endoplasmático com a formação de estrutura ligada a proteínas e que se forma no complexo de Golgi através da ação de duas glicosiltransferases Kre6 e Skn1 [39].

Um método para completo fracionamento da biomassa de levedura e isolamento de vários componentes como invertases, fosfolipídios, ergosterol, glucanas, mananas e glicoproteínas, com funções específicas importantes, foi sugerido por Kollar et al. [84]. Os principais componentes da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido isolados e purificados e suas principais propriedades estudadas [9 e 62].

Kollar et al.[84] conseguiu separar os componentes da parede celular solubilizando a região de ligação entre o 1,3-beta-glucano e quitina isolando os oligossacarídeos, após a digestão da parede celular com beta (1-3)-glucanase e subsequente incubação com quitinase. MCCLEARY et al. [100], através da utilização de enzimas como a β -glucosidase e oxidase-peroxidase conseguiu separar e quantificar as betas-glucanas presentes.

A levedura autolisada é separada em duas partes através da centrifugação, o extrato de levedura que pode ser enviado para secagem em um “spray dryer” e a parede celular. Esta parede celular ainda carrega consigo um pouco de proteínas e deve ser lavada, tratada com álcali e centrifugada. Em seguida deve ser enviada para “spray dryer” para secagem. [140].

3.1.1 Aplicações de Leveduras e seus Componentes

A aplicação de leveduras na indústria de alimentos incluem: uso em fermentações tradicionais para a produção de etanol, enzimas industriais, tratamento de resíduos industriais (Ex : diminuição da DBO do soro de leite), cepas de leveduras que fermentam o soro de leite, como ingredientes de sabores, leveduras como fontes de vitamina B12, aplicação de leveduras como ingredientes em “health foods” (leveduras enriquecidas com fonte de selênio, cromo, molibidênio, etc), componentes da parede celular (beta-glucanas) utilizadas como espessantes em indústrias de alimentos. [63]

Bekers, M. et al. [13], utilizaram beta-glucanas em iogurtes com bactérias lácticas (*Bifidobacterium sp*) em substituição a ácidos graxos insaturados como estabilizante. Estudos vêm mostrando a utilização de beta-glucanas com propriedades de hidrocolóide. Utilizado como estabilizante de espumas e emulsões, aumentando a tensão superficial entre água-óleo [15].

Morgan, K.R. [118], descreveu o produto beta-glucana como capaz de formar gel, e que este produto pode ser utilizado como filme comestível. Outros autores, Young-Tack-Lee et al.[193] utilizaram beta-glucana para melhorar a textura de produto de arroz extrusado.

Sidoti et al. [154], descrevem as propriedades das glucanas como espessantes em alimentos, sendo este um produto não calórico, podendo ser utilizado como ingrediente em salsichas, lingüiças, em molhos para saladas, aplicações em produtos análogos a queijos e também em sobremesas e sorvetes. Wahlstron et al. [190] descrevem os efeitos benéficos das glucanas em fermentações evitando a formação de grumos nos fermentadores, deixando que a fermentação ocorra mais uniformemente, ex: produção de vinhos. [190].

A natureza inerte das glucanas de leveduras, que tem sido utilizadas como excelente fonte de fibras, hoje são incorporadas em formulações alimentícias para humanos. Além de melhorarem as funções digestivas, produzem um efeito de abaixamento nos níveis de colesterol do sangue [44].

As glucanas de levedura, solubilizados por alcalis contendo (1,3)-beta-glucana e (1,6)-beta-glucana estimulam significativamente o sistema imune. [54]. Especialmente benéficos para a saúde, o polissacarídeo (1,3)-beta-glucana tem sido estudado, pois produzem uma indução imunológica, hipocolesterolemia e efeitos hipoglicêmicos em animais e humanos [86]. Um dos maiores componentes da parede celular, beta-glucana, é conhecida como ser capaz de aumentar a função imune, especialmente pela ativação de macrófagos. Utilizando o polissacarídeo beta-glucana purificada, e um composto não purificado, e observando a ação destes em ratos com peritonite induzida por *E. coli*, verificou-se que os ratos utilizados como controles morreram, enquanto os tratados com beta-glucana pura todos sobreviveram, e os tratados com beta-glucana não pura, obteve-se apenas um resultado marginal na proteção dos ratos [67].

Os efeitos terapêuticos das glucanas ainda estão sendo estudados, mas o que se pode afirmar, é que ocorre um estímulo do sistema retículo endotelial que induz um aumento de macrófagos, e também ocorre uma alteração no fluxo de Ca^{2+} a nível alveolar, que é um importante mediador de leucócitos em inflamações pulmonares [95].

Com a administração intramuscular 0,5mg/kg de derivados solúveis de 1,3-beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae* para verificação de reação imunológica e acompanhamento da atividade de neutrófilos e monócitos, verificou-se um aumento expressivo destas células, demonstrando que é um produto eficiente na indução imunológica [98].

As propriedades imunológicas das glucanas podem ser devido às características físico-química, que são decorrentes de sua estrutura molecular e arranjo dos componentes monoméricos na matrix glucana que possuem uma configuração de tripla hélice [140].

As beta glucanas, nas concentrações de 10% ou 20%, promoveu abaixamento os níveis de triacilgliceróis séricos, diminuição da digestibilidade aparente (Dap) de proteína, mas não afetou o valor biológico(Vbap). Houve, entretanto, um aumento na velocidade de trânsito do conteúdo intestinal e aumento no comprimento do intestino delgado em ratos Wistar, utilizados no experimento, tratados com uma dieta hipercolesterolêmica [129].

Produtos contendo 1,3-beta-glucana e 1,6-beta-glucana para aplicação externa (uso tópico), mostraram propriedade antiinflamatória e reduziram efeitos de irritações na pele [67].

3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O conceito de alimentos funcionais provém da hipótese de que a dieta alimentar possa controlar e modular várias funções orgânicas, contribuindo para a manutenção da saúde e reduzindo o risco do aparecimento de patologias[13].

Os alimentos funcionais possuem marcadores biológicos de sua função no organismo. Estes marcadores são, por exemplo, aumento do número de bactérias não-patogênicas, no organismo, que auxiliam na digestão e absorção de nutrientes, aumento à tolerância à lactose e imunoestimulação [13].

Para que um alimento seja classificado funcional ele deve: I exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, II fazer parte da alimentação usual, III possuir efeitos positivos obtidos através de quantidades não tóxicas que devem persistir mesmo após a

suspensão de ingestão e IV não devem ser utilizados com o intuito de tratar ou curar doenças [113].

Os alimentos funcionais podem ser subdivididos em: probióticos, prebióticos e simbióticos. Os prebióticos são alimentos que não sofrem hidrólise ou absorção no intestino delgado; quando atingem o cólon, devem ser metabolizados seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas e devem ser capazes de induzir efeito fisiológico que seja importante para a saúde. Os probióticos foram definidos como organismos vivos que quando ingeridos promovem efeito benéfico no balanço da flora bacteriana intestinal e na saúde do hospedeiro. Os simbióticos são aqueles alimentos que reúnem todas as características já mencionadas [46].

Diversos estudos, investigações epidemiológicas e experimentos em animais *in vivo* e *in vitro*, têm demonstrado 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 [41, 188, 194, 189, 38].

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes, bloqueadores de radicais livres. Além destes há os indutores da morte celular, inibidores das enzimas do citocromo P450, inibidores enzimáticos, outros inibidores da angiogênese, antagonistas de fatores de crescimento, hormônios e agentes reparadores de lesões do DNA [72 e74]

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação [108 e 153]. A classificação mais utilizada para estas substâncias é a que os divide em dois sistemas: enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo e não enzimático, composto pelas vitaminas e outros como flavonóides, licopenos e bilirrubinas [153].

Ferrari & Torres [40] descreveram várias substâncias com efeitos antimutagênico, tais como ácido fólico, cálcio, catequinas, fenil-isotiocianatos, índol-3-carbinol, isoflavonóides, limoneno, vitamina D, E, selênio, ritinóides e resveratrole. O ácido fólico, presente principalmente no espinafre, brócolis e alface, está descrito como capaz de auxiliar no reparo de lesões do DNA. O cálcio, encontrado principalmente nos derivados do leite, possui a capacidade de induzir apoptose e liga-se aos ácidos biliares que são agentes ativos na produção de radicais livres. As catequinas, encontradas nos chás verdes e preto, promovem inibição do citocromo P450 e da cicloxigenase, promovem ainda inibição de angiogênese, induzem apoptose de células tumorais, em especial as prostáticas. Os limonenos,

presentes, principalmente, nas frutas cítricas, possuem atividade inibitória da enzima farnesil-transferase que age na ativação de oncogenes. A vitamina D que induz apoptose e diferenciação celular está presente em óleos e gorduras vegetais. No entanto, esta atividade está intimamente relacionada à exposição ao sol. A vitamina E e o selênio apresentam propriedades semelhantes e são capazes de promover imunestimulação e diminuição das espécies de oxigênio reativas. A vitamina E é vastamente encontrada em óleos e gorduras, já o selênio em vegetais verdes cultivados em solos ricos neste elemento. Os retinóides promovem inibição da enzima tumoral ornitina-descarboxilase (ODC), do IGF-I e da angiogênese, além de ativar apoptose pela indução das caspases e inibição da telomerase, e indução de diferenciação do TGF- β . Os resveratróis são encontrados nas cascas de uvas, sucos e vinhos tintos e causam indução de morte de células cancerígenas, inibição da interação de hormônios androgênicos com seus receptores em células de câncer prostático, principalmente.

Os antioxidantes agem em três linhas de defesa orgânica contra as espécies de oxigênio reativas: I prevenção, que se caracteriza pela proteção contra formação das substâncias agressoras; II interceptação de radicais livres, os quais uma vez formados iniciam suas atividades de danificação do DNA; III quando a prevenção e interceptação não foram efetivas e os subprodutos da atividade dos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades podendo se acumular no organismo [83 e 149].

Os alimentos contendo agentes antioxidantes constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármacos-alimentos [38].

Segundo Raymundo (2004)[109], as maiores fontes de β -Glucana são a aveia, cevada, e cogumelos como o *mitake* e o *shitake*. Apesar destes alimentos não serem tão comuns na dieta dos brasileiros a sua introdução é possível. Os cogumelos, em especial, são característicos da culinária japonesa e possuem um alto custo o que pode inviabilizar a sua utilização.

Os cereais, em especial, cevada e aveia, são considerados baratos, de fácil preparo e altamente nutritivos e podem compor pães, massas, biscoitos, tortas e podem ser transformadas em farelos que são utilizados no enriquecimento de molhos, iogurtes, e outros alimentos líquidos e pastosos em geral.

As β -Glucanas não são degradadas pelas enzimas humanas, o que lhes confere propriedades de fibras alimentares. O maior interesse nestas fibras é devido ao seu efeito protetor hipocolesterolêmico comprovado, reduzindo risco de doenças crônicas.

Apesar de todas estas evidências e mecanismos de ação anteriormente citados, percebe-se que, na verdade não são os compostos isolados e ingeridos sob a forma de suplementos que diminuem o risco de câncer, mas sim uma dieta rica em substâncias anticarcinogênicas, incluindo novos compostos recentemente isolados, que ainda se encontram em estudo. No entanto, o isolamento de compostos e os testes se fazem necessários para que a comunidade científica possa prever seus efeitos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DA β -GLUCANA

A β -glucana é um dos componentes presente em maior quantidade nas paredes celulares e constituem-se por um esqueleto central linear de moléculas de D-glicose ligadas na posição β -(1 \rightarrow 3) contendo cadeias laterais de glicose (ligação β -1 \rightarrow 6) de tamanhos variados que ocorrem em diferentes intervalos ao longo do esqueleto central. A extração fornece uma suspensão de partículas de β -1,3 poliglicose [31]. A localização deste polissacarídeo se faz na camada intermediária da parede celular das leveduras, adjacente à membrana plasmática, e sua função é manter a rigidez e a forma da célula[148].

As β -glucanas agem através da estimulação do sistema imune do hospedeiro exercendo um efeito benéfico sobre uma variedade de infecções de origem bacteriana [180], viral [139], fúngica [109], e parasitária [61]. Têm sido descritas como moduladoras tanto da imunidade humoral quanto celular [131]; [153, 32, 168 176, 76,]; sua eficiência está comprovada em infecções, tumores [75 e 117] e como estimuladora da hematopoiese [128 e 55]. Existem relatos a respeito da ativação de macrófagos [167] neutrófilos [137] e células “Natural Killer” [26] sendo considerada uma candidata promissora como agente imunoestimulatório para pacientes imunocomprometidos ou infectados com bactérias multidroga-resistentes.

Além das propriedades anteriormente descritas, as β -glucanas têm despertado o interesse, de pesquisadores, na área genética, especialmente na sub-área de mutagênese. Estudos recentes tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstram sua eficácia significativa na prevenção de efeitos mutagênicos causado por agentes tais como o peróxido de hidrogênio [156], doxobubicina (LIN e cols., 2004) e ciclofosfamida [16, 17 e 174].

Alguns tipos de β -glucanas já estão licenciados para o uso terapêutico, como por exemplo lentinam (1-3- β -D-glucana), extraída do cogumelo *Lentinus edodes* e usada como adjuvante na terapia anti-tumoral no Japão. Estudos experimentais demonstraram que o lentinam pode ser protetor em infecções causadas por *Listeria*, *Mycobacterium tuberculosis* e vírus influenza [119], 2000).

Utilizando glucana derivada do *S. cerevisiae* para o tratamento de infecção por *S. aureus* resistentes a antibióticos em ratos, Liang et al (1998) [91] observaram que a glucana auxilia na eliminação da bactéria e que este evento é seguido de um aumento de monócitos e neutrófilos bem como por uma potencialização da atividade antimicrobiana. Em outro estudo, Kaiser & Kernodle (1998) [74], utilizaram a glucana associada ou não a antibióticos para tratamento de animais infectados por *S. aureus*, verificaram que a associação da glucana e o antibiótico (cefazolin) demonstrou 8 a 20 vezes mais eficiência quando comparado aos animais que receberam somente o antibiótico.

A capacidade da glucana em induzir resistência inespecífica e específica em patologias infecciosas em camundongos foi analisada por Reynolds et al. (1980) [139], e estes observaram que o pré-tratamento, mas não o pós-tratamento, determinava um aumento na sobrevivência de camundongos expostos ao vírus da encefalomielite eqüina venezuelana. Ainda dados deste mesmo grupo de pesquisadores demonstram que o pré-tratamento de camundongos com glucana por via intravenosa determinava um aumento na resistência à exposição destes animais à cepa virulenta, *Francisella tularensis*, quando os resultados eram comparados com o protocolo onde os animais recebiam a glucana via intranasal. Mas, para o estudo com cepas de *Pseudomonas pseudomallei* estes resultados mostraram-se invertidos, ou seja, a via que demonstrou maior eficácia foi a intranasal. Este grupo ainda demonstrou que a vacina da encefalomielite eqüina venezuelana associada a glucana era mais protetora, para camundongos e macacos, do que a vacina sem adjuvante.

Meira et al. (1996) [109] demonstraram que a associação de glucana a anti-fúngicos específicos no tratamento da paracoccidioidomicose possibilita uma melhor resposta à terapia devido ao efeito imunestimulador da glucana sobre o sistema imunológico. Segundo estes pesquisadores um grupo de nove pacientes em estágio avançado da doença foram tratados com anti-fúngico específico e nestes a glucana foi utilizada como imunestimulante. Os resultados deste grupo foram comparados com um outro grupo composto por oito pacientes que se encontravam em estágio da doença menos avançado e que receberam somente o anti-fúngico. A análise dos resultados clínicos permitiu verificar que dentre os primeiros pacientes apenas um apresentou recaída e no segundo grupo foram cinco

casos. Valores da taxa de sedimentação de eritrócitos mostraram uma diferença significativa entre os pacientes do primeiro grupo quando foram comparados os níveis de pós e pré-tratamento. Verificou-se também a redução significativa de anticorpos séricos para *P. brasiliensis* nos pacientes que se encontravam em estágio avançado da doença quando estes foram analisados no período pós-tratamento. O teste intradérmico com fitohemaglutinina mostrou aumento significativo de positividade entre pacientes do primeiro grupo quando comparados nas fases de pós e pré-tratamento. Os níveis séricos de TNF- α também foram significativamente altos nos pacientes do primeiro grupo durante o tratamento.

Estudos na área de infecção parasitológica de Yun et al(1998) [185], demonstraram que a administração de glucanas, em camundongos infectados por *Eimeria vermiformes*, aumenta a resistência destes animais devido à modulação tanto da resposta inespecífica quanto da específica. Outro estudo, Soltys e cols. (1996) [159], investigaram o efeito da glucana associada com imunoglobulinas e zinco na resposta mitogênica de linfócitos, níveis de anticorpos e recuperação das larvas em camundongos infectados por *Toxocara canis* e observaram que a glucana restaurou parcialmente a resposta das células T e B aos mitógenos e que não houve um aumento do nível de anticorpos circulantes específicos. A comparação do número de larvas encontradas nos músculos dos animais demonstrou uma redução naqueles que receberam a glucana.

Os estudos de Di Luzio et al. (1979) [28] demonstraram que duas preparações de glucanas extraídas de *S. cerevisiae*, uma solúvel e outra particulada, foram capazes de causar uma redução significativa no crescimento de carcinomas mamários e em melanomas B16. Estes mesmos extratos foram também eficientes em aumentar a sobrevivência de camundongos, A/J e C57BL/6J, com implante tumoral subcutâneo. Preparações similares de glucana solúvel e particulada também foram testadas quanto à estimulação da hematopoiese por Hofer & Pospisil (1997) [58] e neste estudo demonstrou-se que a administração, de glucana solúvel e particulada, vinte e quatro horas antes ou após vários regimes de irradiação com doses sub-letais foi capaz de estimular a hematopoiese. Dados deste mesmo estudo também relatam que a sobrevivência dos camundongos foi aumentada no grupo que recebeu as preparações de glucana. Assim os autores sugeriram que o estímulo da hematopoiese pela administração da glucana é o principal mecanismo que confere proteção contra os efeitos da radiação.

Estudos *in vivo*, realizados por Chorvatovicová et al. (1996 e 1998) [19 e 20], relatam a eficiência da glucana, de baixo peso molecular – $0,89 \times 10^5$, em prevenir os efeitos mutagênicos da ciclofosfamida. Em um dos estudos os pesquisadores administraram

duas doses de ciclofosfamida (80 mg/kg, intra peritoneal.p.) com um intervalo de 24 horas. A glucana foi administrada em duas concentrações, 100 ou 200 mg/kg, por duas vias: i.p. 24 horas antes da ciclofosfamida e i.v. 1 e 2 horas anteriores às injeções do agente mutagênico. Outros dois grupos de animais foram tratados oralmente com a glucana na concentração de 100 mg/kg anteriormente às administrações de ciclofosfamida. Os danos causados pelo agente mutagênico e os efeitos protetores da glucana foram analisados através do ensaio do micronúcleo realizado em células da medula óssea e observou-se que as três formas de administração da glucana (intra peritoneal.. e venosa.) mostraram-se eficazes na prevenção dos efeitos clastogênicos da ciclofosfamida. Os autores relatam ainda que a ação protetora das vias intraperitoneal e intravenosa são dose-dependentes logo houve uma maior eficácia naqueles animais que receberam a maior dose (200 mg/kg). No entanto, o efeito protetor foi observado, de modo significativo, em todos os grupos. Outro trabalho deste mesmo grupo relata testes com uma outra glucana, também de baixo peso molecular – $0,19 \times 10^5$, onde se desenvolveu um protocolo muito semelhante, ao anteriormente citado, excetuando o grupo que recebeu a glucana i.v. Neste estudo os autores também relatam efeito antimutagênico da glucana tanto na administração v.o. quanto na i.p..

Os efeitos antigenotóxicos da glucana também foram demonstrados por Tohamy e cols. (2003) [174] em camundongos que receberam ciclofosfamida, *adramycin* e *cisplatin*. Estes estudiosos relatam que camundongos que receberam 2,5 mg/kg de ciclofosfamida, 12 mg/kg de *adramycin* e 5 mg/kg de *cisplatin* (i.p.) quando comparados àqueles que foram pré-tratados com 100 mg/kg de β -glucana (i.p.) apresentaram uma redução de 41,1, 26,9 e 57,7% de aberrações cromossômicas em medula óssea e 44,4, 55 e 57,1% em espermatogônias, respectivamente. Estes autores sugerem que o efeito protetor da β -glucana deve ser atribuído à sua capacidade de capturar os radicais livres produzidos quando da biotransformação destas três drogas antineoplásicas estudadas. O índice mitótico também foi estudado e este dado demonstrou que a β -glucana foi capaz de estimular a hematopoiese restabelecendo a atividade mitótica das células da medula óssea uma vez que esta função havia sido suprimida pelas drogas.

Estudos, *in vitro*, de Slamenová et al. (2003) [156] demonstraram que três diferentes glucanas (Carboxymethyl glucan - CM-G; Sulfoethyl glucan - SE-G; Carboxymethylchitin-glucan - CM-CG), foram eficientes em prevenir as lesões no DNA em cultura da linhagem de células pulmonares de hamster (V79) sendo a quantificação dos danos realizada através do ensaio do cometa. A maior eficiência foi demonstrada pela CM-CG,

seguida pela SE-G e por fim a CM-G. Neste trabalho os autores relatam o efeito da β -glucana pela sua capacidade de reagir com os radicais OH liberados pela biotransformação do peróxido de hidrogênio.

3.4 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE

Assim como têm sido usados ensaios para determinação de substância de ocorrência ambiental, natural ou devido a ações antropogênicas, com potencial mutagênico e/ou carcinogênico; os mesmos procedimentos podem ser empregados para identificar antimutagênicos e anticarcinogênicos. A pesquisa por agentes que possam reduzir a frequência de alterações no DNA tem se mostrando promissora e com importantes implicações nas práticas terapêutica devido à possibilidade da redução da taxa de mutação e conseqüente redução na incidência de câncer.

Qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica. Posteriormente, as mesmas podem ser classificadas como bio-antimutagênicas ou desmutagênicas [50 e 186].

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 [31, 55].

Substâncias desmutagênicas são capazes de inativar um agente mutagênico por ação indireta. Há pelo menos três modos de ação dos agentes desmutagênicos: inativação química ou enzimática, na qual o agente mutagênico é neutralizado após passar por um processo de metabolização, principalmente das enzimas de fase II, e encaminhados para excreção; prevenção da formação de espécies ativas, seja por inativação de enzimas metabolizadoras, como o citocromo P450, ou por ligação direta com o agente mutagênico impedindo sua ativação; e pelo seqüestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impedindo que os mesmos entrem em contato com o material genético [55, 69, 35 e 30].

Os anticarcinogênicos são substâncias capazes de impedir, retardar ou reduzir o surgimento ou desenvolvimento de tumores e podem ser classificados em

substâncias que inibem: a formação de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos a partir de precursores; chegada do carcinógeno às células específicas, também denominados agentes de bloqueio; a expressão de características malignas, também chamados de agentes supressores [82].

O uso diário de antimutagênicos e anticarcinogênicos, futuramente, será o procedimento mais efetivo para prevenir o câncer e as doenças genéticas humanas. Dentre as maneiras de prevenir ou reduzir a mutagênese pode-se citar os compostos químicos que agem no reparo de DNA ou no metabolismo do agente mutagênico, sendo, desse modo, antimutagênicos efetivos. Estes compostos possuem efeitos freqüentemente específicos para certas classes de mutágenos e/ou certos sistemas testes[118]. Ao uso diário de produtos antimutagênicos ou anticancerígenos dá-se o nome de quimioprevenção [47 e 166]. Para a quimioprevenção faz-se necessário o uso de agentes quimiopreventivos, os quais devem apresentar as seguintes características: pouco ou nenhum efeito colateral; alta eficácia; possibilitar a administração por via oral; ter um mecanismo de ação conhecido; e ser de baixo custo [35].

Dentre os estudos da área de mutagênese o potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica, e então se deve observar uma redução das lesões produzidas no DNA [68].

A atividade antimutagênica tem sido demonstrada em frutas e vegetais[68]. Várias substâncias obtidas a partir de fontes naturais têm sido isoladas, identificadas e alguns dos mecanismos de sua atividade estão sendo esclarecidos. A N-acetil-I-cisteína, ácido p-aminobenzóico (PABA), isotiocianetos aromáticos, clorofilas e derivados, glutathione, vitamina C, vitamina E, vitamina A, flavonóides, ácidos graxos, fibras dietéticas são algumas das substâncias antimutagênicas conhecidas e encontradas na dieta [45, 2, 3, 55, 100 e 121].

Estudos epidemiológicos corroboram estes dados citados anteriormente uma vez que há um grande volume de evidências associadas, a dados obtidos a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, que apontam para a estreita relação entre constituintes da dieta e o risco de desenvolvimento de determinados tipos de câncer. De modo geral, vegetais, frutas, fibras e alguns micronutrientes diminuem a incidência de câncer; enquanto gorduras, excesso de calorias e consumo de álcool aumentam o risco de desenvolvimento de patologias. Porém, o fato dos alimentos serem misturas complexas dificulta a interpretação dos resultados, assim como a interpretação das diferenças interindividuais ocorridas [5]. Mesmo assim, no setor

alimentar, os cogumelos comestíveis têm sido bastante pesquisados em relação à sua capacidade mutagênica, antimutagênica e antitumoral. Algumas espécies como o *Lentinula edodes*, *Craterellus cornucopioides*, *Agaricus abruptibulbus*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius lilacinus*, *Lyophyllum connatum*, *Xerocomus chrysenteron* e o *Agaricus blazei* já demonstraram atividade antimutagênica [49, 86, 110, 98, 53 e 126].

Ainda que sejam observadas inconsistências e que a interpretação dos dados sobre dieta e atividade antimutagênica e/ou anticarcinogênica sejam ainda contraditórias, existe a certeza de que a dieta alimentar está diretamente relacionada com a maior ou menor ocorrência de câncer, o que estimula a continuidade dos estudos. Em outros casos, ainda se faz necessário testar algumas substâncias que podem ser extraídas de componentes da dieta como é o caso das β -glucanas que deixam indícios de possuir uma ação efetiva.

3.5 ASPECTOS DA MUTAGÊNESE

As informações genéticas dos organismos vivos estão concentradas nas macromoléculas denominadas ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo essa informação especificada pela seqüência de bases nitrogenadas. Toda a informação genética de um organismo é transmitida de célula a célula durante o desenvolvimento, e de geração a geração durante a reprodução, pela replicação precisa da seqüência de bases nos ácidos nucleicos [157].

A informação genética deve ser transmitida de geração em geração com considerável precisão, mas esta molécula não é estática. Ocasionalmente há a presença de mutações que é um dos eventos capazes de produzir variabilidade genética e que fornece a matéria-prima para a evolução [157].

As mutações são modificações súbitas e hereditárias no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética pré-existente [193]. No entanto, estas alterações podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou da exposição do organismo a agentes químicos e físicos (mutações induzidas) [87].

Segundo Kirsch-Volders e cols. (2002) [73] há três tipos de mutações: gênicas, alterações cromossômicas estruturais e numéricas.

Os agentes mutagênicos químicos podem ser divididos em dois grupos: agentes que influenciam tanto no DNA replicante quanto no DNA não replicante, estes são os agentes alquilantes, corantes acridina e o ácido nitroso; o segundo grupo é composto por substâncias que interagem apenas com o DNA replicante, tais como os análogos de base [157]

Existem substâncias que atuam de maneira direta, sem necessidade de sistema de metabolização, tais como a mitomicina-C e o metilmetanosulfonato; e outras que atuam de maneira indireta, as quais danificam o DNA somente após a sua metabolização como a ciclofosfamida e do 2-aminoantraceno [14, 132 e 133].

Poucos agentes mutagênicos induzem somente um tipo de dano no DNA. A maior parte deles exibe um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA (modificações de base, resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de filamentos ou incorporações de bases modificadas), e os subseqüentes efeitos secundários causados pela resposta do organismo a estas modificações. Estes efeitos secundários podem incluir a ação de várias formas de reparo e a replicação de filamentos filhos sobre moldes modificados [134 e 193]. Além disso, o mesmo agente mutagênico pode produzir diferentes espectros mutagênicos em organismos com diferentes conjuntos genéticos [42]. No entanto, os danos no DNA estão sujeitos aos processos de reparo [30]. Segundo Van Goethem e cols. (1997) [183], dependendo da capacidade de reparo, do estágio do ciclo celular e do tipo de agente mutagênico somente uma pequena parte dos danos sofridos proporcionarão o aparecimento de mutações que serão fixadas.

3.6 CULTURA DE CÉLULAS

Sistemas testes de curta duração são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos ou antimutagênicos ambientais [76]. Dentre estes sistemas destaca-se a cultura de células de mamíferos *in vitro*, como a cultura de linfócitos humanos e as linhagens celulares provenientes de hamster chinês [179].

Estes sistemas-teste apresentam vantagens tais como: facilidade de padronização das condições experimentais como a densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo e outras; possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, além de serem ensaios econômicos e de boa reprodutibilidade;

o material é relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; a organização dos cromossomos e do seu DNA é a mesma das células *in vivo* [136 e 142].

Nos testes realizados com células de mamíferos as células V79 e CHO-K₁ são as mais freqüentes. A avaliação dos danos causados por diferentes xenobióticos é feita principalmente através das técnicas de micronúcleo [1, 112 e 94] , cometa [73 e 41], alterações cromossômicas [1, 101 e 150] e trocas de cromátides irmãs [150]. Estas células apresentam algumas vantagens como: facilidade de crescimento em cultivo; pequeno número de cromossomos; ciclo celular curto (10 a 12 horas) e fornecem uma alta freqüência de metáfases analisáveis. Porém algumas desvantagens também são encontradas: cariótipo variável (21 cromossomos ± 1); geralmente formam populações celulares não sincrônicas; apresentam uma considerável heterogeneidade nos tempos de ciclo celular e são células transformadas [134].

A mutagênese também é estudada em células deficientes em mecanismos de reparo, como é o caso da mutante *xrs5* da CHO [146 e 64]. Esta célula apresenta deficiência na reunião de quebra de fita dupla, devido a não produção da proteína Ku80, envolvida no reparo NHEJ [64]. Células mutantes deficientes em reparo de fita dupla são suscetíveis à radiação X, mas apresentam sensibilidade cruzada com a bleomicina e com agentes alquilantes. Estudos citogenéticos demonstram que estas linhagens celulares apresentam uma maior quantidade de alterações cromossômicas espontâneas e a freqüência de alterações induzidas por agentes, como o metilmetanosulfonato, é bem maior quando comparada com as linhagens selvagens, principalmente na freqüência de quebras cromatídicas [175].

In vitro as células V79, CHO-K₁ e CHO-*xrs5* são cultivadas na forma de cultura de adesão em monocamada, utilizando um meio de cultivo como fonte de nutrientes com acréscimo de soro bovino fetal, para o fornecimento de fatores indutores de mitose. Nestas condições as células podem ser liberadas dos frascos de cultivo através de uma enzima proteolítica (tripsina) e transportadas para novos frascos de cultivo, onde poderão ser mantidas em crescimento ou serem submetidas aos tratamentos conforme o protocolo e o teste a ser empregado [95](LUIZ, 2002).

A maioria das linhagens celulares utilizadas em ensaios *in vitro* não tem capacidade de metabolização de drogas, havendo a necessidade, portanto, da adição de sistemas endógenos de metabolização, como o S9 (fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254) [135 e 168]. No entanto, algumas linhagens como a CRO22-HTC (hepatoma de ratos) são células metabolizadoras e as suas culturas têm sido padronizadas em protocolos experimentais.

Sistemas de cultura de células de mamíferos possuem importante e significativa utilização na detecção de mutagênese e antimutagênese ambiental com testes rápidos, sendo um excelente sistema de triagem de substâncias. Nestes sistemas, a mutagenicidade de alguns carcinógenos que são negativos em testes de mutagenicidade microbiana, pode ser detectada através de alterações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e outros. No entanto, os resultados obtidos de testes realizados *in vitro* não podem ser extrapolados para tecidos humanos, os quais possuem sistemas específicos de ativação e inativação metabólica para substâncias pré-carcinogênicas. Deve-se então levar em consideração as particularidades dos mecanismos de absorção, acumulação e eliminação de xenobióticos, e o grande número das possíveis interações entre as centenas ou milhares de compostos, os quais, *in vivo*, poderão levar a efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos, que não podem ser simuladas em teste *in vitro*. No entanto, o sistema *in vitro* tem se mostrado eficiente na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos, apesar dos experimentos com animais vivos reproduzirem com maior semelhança às condições humanas [76].

Além das adversidades anteriormente mencionadas o resultado positivo *in vitro* não é garantia da positividade *in vivo*, mas serve como uma alerta da periculosidade do xenobiótico testado. O sistema *in vitro* é de grande importância por fornecer dados fundamentais sobre a ação de substâncias testadas, como clastogênica, aneugênica, ação direta ou indireta sobre o DNA e nível de toxicidade [168].

3.7 ENSAIO DO MICRONÚCLEO

O teste de micronúcleo *in vitro* evoluiu rapidamente na área de genética toxicológica por ser um método simples e útil na avaliação de vários tipos de danos citogenéticos. O teste do micronúcleo tem sofrido várias modificações inovadoras em seu protocolo e este fato aponta para uma ampliação da sua aplicabilidade [147].

Matter & Schmid (1971) [120] estabeleceram o teste do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos. Somente em 1976 este mesmo teste foi desenvolvido *in vitro* por Heddle e nesta proposta este autor trabalhava com cultura de linfócitos periféricos humanos e a aplicabilidade do teste era para detecção de agentes carcinogênicos.

Os micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma. Aparecem na telófase e são resultados de fragmentos acêntricos, originados de quebra isocromatídica ou cromatídica, ou de disfunções no fuso mitótico. Desta forma, podem ser gerados por agentes clastogênicos ou aneugênicos. Pode haver um ou mais por célula, e tais corpúsculos não devem apresentar qualquer conexão estrutural com o núcleo principal [106, 1136 e 73].

A aplicação do bloqueio da citocinese, com a citocalasina-B, permite identificar células que tenham passado por um ciclo de mitose após o tratamento *in vitro*. Esta variação técnica tem transformado o teste do micronúcleo em uma ferramenta útil na triagem de danos genéticos [34]. A citocalasina-B é um potente inibidor dos microfilamentos de actina, impedindo a polimerização dos mesmos na placa equatorial formada no final da telófase, desta forma observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese.

Muitas variáveis podem afetar a reprodutibilidade e sensibilidade do teste do micronúcleo incluindo metodologia, composição química e pureza do composto a ser testado. Dentro dos aspectos metodológicos mais importantes encontra-se a concentração de citocalasina-B. O uso de concentrações sub-ótimas, como de 3 µg/ml, para o bloqueio da citocinese poderia permitir que as células binucleadas, que sofreram duas divisões, também fossem contabilizadas, superestimando os danos genéticos. No entanto, concentrações de citocalasina-B diferentes de 3 e 6 µg/ml conduziram a resultados semelhantes [167].

3.8 ENSAIO DO COMETA

O teste do cometa visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a cometas. Os primeiros pesquisadores que utilizavam a quantificação direta do DNA em células individuais foram (TICE, 1995) [135]. TICE, 1995) [155] incluíram no teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), o que permitiu um aumento quanto à sensibilidade do teste. A eletroforese em pH alcalino (pH > 13) foi introduzida por Singh e cols. (1988)[172] e transformou o ensaio do cometa em uma técnica de grande importância na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios álcali-lábies, *in vivo* e *in vitro*.

A técnica do cometa é um método rápido, simples e sensível para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células, sendo particularmente importante na detecção de diferenças intercelulares, quanto aos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer célula eucariótica onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo com uma amostragem bastante pequena. Além disso os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade do teste do ensaio cometa em detectar danos em células individuais é comparável a outros métodos que avaliam danos em uma população de células[6, 34, 44, 78, 141, 144, 173].

Devido a todos estes motivos o teste do cometa tem sido empregado na avaliação de danos no DNA promovidos por agentes físicos e químicos, no monitoramento ambiental e até mesmo na área clínica (ANDERSON & PLEWA, 1998).

De maneira geral, o teste envolve a deposição de células em agarose, sobre uma lâmina de microscópio, seguido de lise, desnaturação do DNA e eletroforese em pH alcalino ($\text{pH} > 13$), e finalmente a análise dos cometas gerados pelo DNA fragmentado. Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e condições do experimento variam consideravelmente. Muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose LMP, composição da solução de lise, tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese, as condições de corrida, a coloração do DNA, entre outros (OLIVE et al., 1992; SPEIT & HERTMANN, 1999) [124 e 161].

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente [82], utilizando-se coloração com um agente intercalante fluorescente: o brometo de etídio, e um microscópio de fluorescência. Desta forma os cometas poderão ser classificados em: classe 0 – núcleos não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – núcleos com cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 – núcleos com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 – núcleos com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo. Núcleos de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados [161].

ARTIGO 1

Otimização da extração de Glucanas insolúveis da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Autor: Hevenilton J. Matiazi
Universidade Estadual de Londrina
e-mail: heveniltonmatiaz@uol.com.br

Resumo

Recentemente as glucanas têm se destacado entre os ingredientes de interesse para as indústrias de alimento e farmacêutica por suas características de alimento funcional (fibra alimentar) e pela ação hipocolesterolêmica, hipoglicêmica, capacidade de aumentar a resistência imunológica e ação anti-mutagênica, respectivamente. A otimização da extração das glucanas insolúveis da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente do descarte das indústrias sucroalcooleira e cervejeira, foi iniciada com a autólise da levedura utilizando uma temperatura de 49°- 55°C, pH 5,0 – 6,0, durante 6,0 - 8,0 horas e uma concentração de levedura de 25% (peso seco/ volume) e em seguida foram definidos os parâmetros da extração das glucanas da parede celular obtida nos dois experimentos aplicando a Metodologia de Análise de Superfície de Resposta, sendo o primeiro um delineamento fatorial completo de duas variáveis independentes, pH e temperatura, com três níveis de variação, 3^2 , e um tempo de processo de 5 horas. Em um segundo experimento com um delineamento fatorial central composto rotacional com 2 variáveis independentes, tempo e temperatura, com quatro níveis de variação, 4^2 , utilizando uma concentração de levedura igual à do primeiro experimento. As melhores condições de extração das glucanas foram: temperatura entre 60 - 78°C; pH entre 9,7 e 10,5 em um período de tempo de 4,5 a 6,0 horas. A confirmação da extração das glucanas foi realizada através da identificação bioquímica do produto extraído utilizando Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN), onde pôde ser confirmada a presença de (1,3) Beta -D-glucana e (1,6) Beta D-Glucana. A pureza da glucana foi em média de 87,6%.

Summary

Extraction Optimization of Insoluble Glucans from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.

Recently, glucans have been considered as one of the most important ingredients for the food and pharmaceutical industries, mainly because their functional foods characteristics (alimentary fiber) and for their hypocholesterolemic, hypoglycemic action, capacity for effective immunity system improvement and anti-mutation actions, respectively. Extraction optimization of the insoluble glucans from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* produced in the sugar/alcohol and breweries industries, was initiated with an autolysis of the yeast cell for wall production at a temperature of 49°-55°C, pH 5,0 – 5,5 during 6,0 – 8,0 hours and with yeast suspension concentration of 25% (dry weight /volume) following by two experiments applying Surface Response Analysis Methodology, being the first a Complete Compost Factorial design with two independent variables, pH and temperature, with two levels of variation, 3^2 , and five hours of processing time. The second experiment was a Rotational Complete Factorial design with two independent variables, time and temperature, with four variation levels, 4^2 , with the same yeast suspension concentration used in the first experiment. The best conditions for the maximal insoluble glucans extraction were: temperature between 68°C and 78°C; pH between 9,7 and 10,5 and a time process of 4,5 to 6,0 hours. The identification of extracted product as glucans was carried out by ^{13}C Spectronic Nuclear Magnetic Resonance, where the presence of (1,3) - D- Beta - glucan and (1,6) D-Beta - Glucan was confirmed. The pureness of the glucans was 87,6%.

Introdução

O Brasil produz atualmente uma grande quantidade de biomassa de levedura, como subproduto das indústrias de cerveja e das destilarias produtoras de etanol. O setor sucroalcooleiro tem uma produção anual de aproximadamente 260 mil ton/ano enquanto que o setor cervejeiro contribui com cerca de 7.000 ton/ano. A maior parte desta levedura é considerada resíduo e utilizada nas lavouras de cana-de-açúcar, ou, simplesmente descartada em rios ou jogadas como lixo orgânico pelas cervejarias causando contaminações no lençol freático, [36].

Tradicionalmente, a levedura tem sido utilizada na indústria de alimentos, como agente de fermentação, na fabricação de pães, cervejas e vinhos e na forma inativa como suplemento nutritivo em produtos naturais, na produção de ração para animais além do uso como matéria-prima para produção de autolisados e extrato de levedura. [9 e 122]

Recentemente, tem havido um interesse grande por parte dos pesquisadores e empresas no isolamento e na purificação de constituintes da levedura, com vista a usos específicos na formulação de produtos com propriedades funcionais diferenciadas. Entre os componentes mais importantes estão os da parede celular : as mananas e as glucanas, mais especificamente as β -D-glucanas (1-3) e (1-6). [140].

A extração de glucanas da parede da *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo realizada por vários pesquisadores, sendo que a metodologia utilizada por cada um, difere nas faixas de temperaturas, pH e tempo de extração, sem citar a utilização de enzimas. O emprego de NaOH 50% e ou KOH 50% tem sido utilizado por vários autores e se mostra eficiente na extração de glucanas insolúveis da parede celular [121, 103 e 127] O método empregado por estes autores baseia -se no tratamento das leveduras com NaOH ou KOH a quente, com temperaturas que variam entre 60°C a 100°C, e com diferentes valores de pH que variam de pH 7,0 até 11.

O objetivo deste trabalho foi identificar as melhores condições de temperatura, pH e tempo, que permitam o melhor rendimento de extração de glucanas insolúveis presentes na parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Material e Métodos

A matéria prima *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na extração da parede celular foi obtida da Usina de açúcar e álcool do Norte do Paraná, a suspensão aquosa de leveduras foi centrifugada e lavada no laboratório, concentrando-a até a obter a proporção desejada de 25% (Peso seco/v). Em seguida a autólise foi realizada a 49°C, pH variando entre 5,0 e 5,5 durante 8,0 horas, segundo trabalho de Martins, A, 2000 [98].

O teor de umidade foi determinado por diferença entre o peso da amostra antes e após a secagem em estufa a 105 ° C por 4 horas. [9]

O teor de cinzas foi determinado por calcinação da amostra a 550 ° C, segundo a técnica descrita pelas normas analíticas da AOAC, 1975[9].

O nitrogênio total foi determinado pelo método de microkjeldhal e, após foi multiplicado o resultado obtido por 6,25 para determinar o conteúdo de proteína (AOAC, 1975) [9].

O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença entre o peso úmido (g) dos sólidos insolúveis presentes nos extratos e a somatória dos teores de umidade, proteína e cinza presentes nos mesmos, seguindo as recomendações de Kollar, R, 1992 [84].

A extração das glucanas foi realizada segundo o esquema apresentado na figura 1. Esta metodologia foi baseada nos artigos dos autores [9, 84, 103 e 190] .

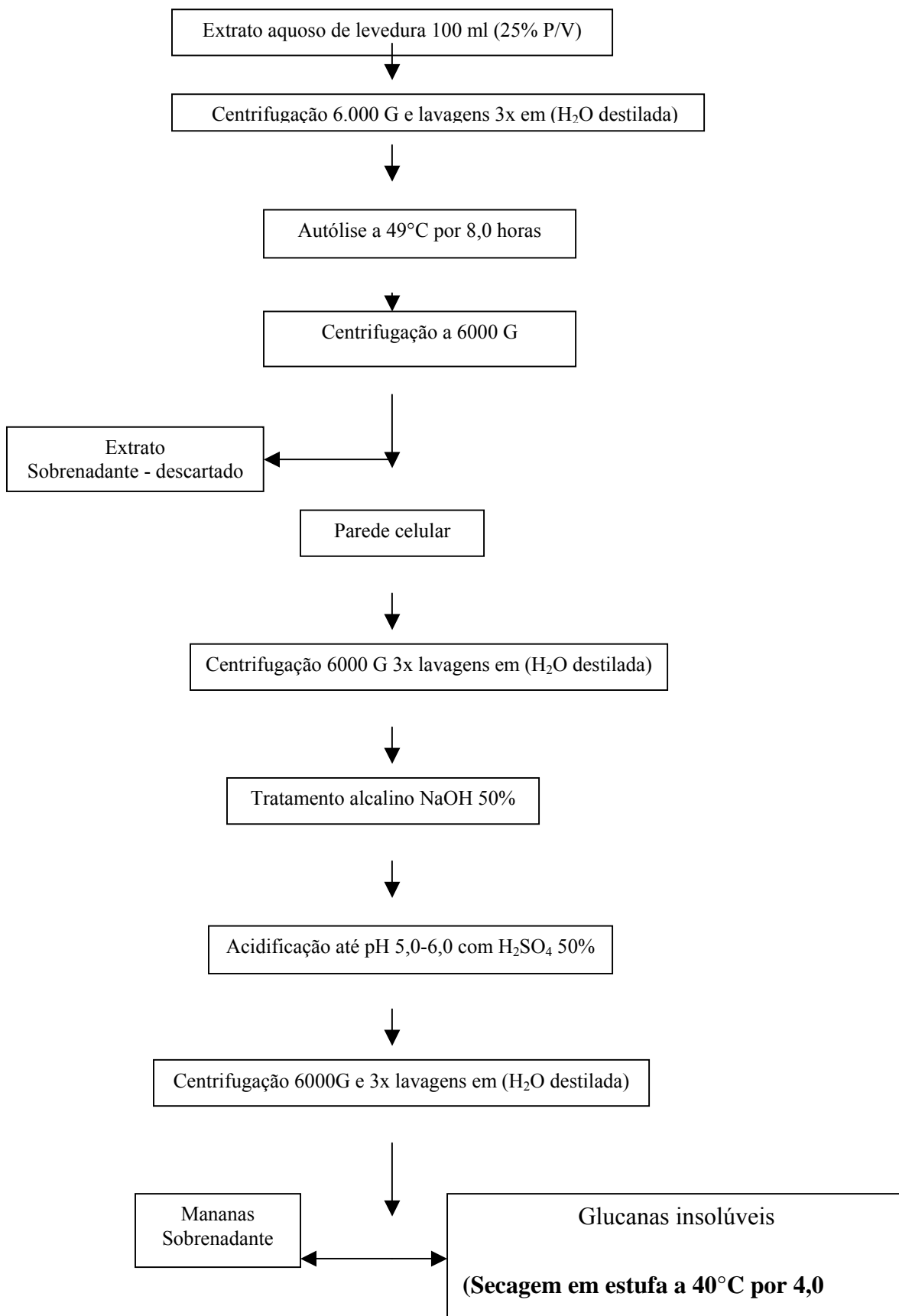


Figura .1 Esquema de extração das beta-glucanas

A identificação das glucanas extraídas da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*, foi realizada utilizando Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13. Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker AC 300/P (75MHz) em tubo de 10 mm de diâmetro, a 80 °C, utilizando como solvente o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram registrados em ppm, sendo utilizado como padrão interno tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,0$) [8].

A Metodologia de Análise de Superfície de Resposta foi empregada para definir os desenhos experimentais e a análise estatística dos dados obtidos nos experimentos. No primeiro ensaio foi aplicado um delineamento fatorial fracionado, pesquisando as interações de duas variáveis independentes, pH e temperatura, em três níveis equidistantes, (3^2) (Tabela 1). O tempo de extração utilizado neste primeiro experimento foi de 5,0 horas. A resposta avaliada para definir as melhores condições de extração das glucanas, foi o teor de carboidratos presentes nos sólidos insolúveis obtidos após a extração da parede celular da levedura.

Tabela 1. Valores reais e codificados dos níveis de variação das variáveis independentes.

Variáveis independentes	Níveis		
	(-1)	(0)	(1)
X ₁ : pH	9,0	10,0	11,0
X ₂ : Temperatura, °C	60,0	70,0	80,0

Após definir os valores dos parâmetros, pH e temperatura, foi realizado um segundo delineamento experimental para definir a melhor condição de tempo para obter o maior rendimento na extração de carboidratos da parede celular da levedura. Neste segundo ensaio foi aplicado um delineamento central composto rotacional da metodologia de superfície de resposta com duas variáveis independentes em quatro níveis de variação, 4^2 , (Tabela 2).

Tabela 2. Valores reais e codificados do planejamento experimental.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,412	(-1)	(0)	(1)	1,412
X ₁ : Tempo	1,0	3,0	4,0	5,0	7,0
X ₂ : Temperatura°C	50	60,0	70,0	80,0	90,0

Resultados e Discussão

Segundo Kollar, R, 1992 [84], a análise de lipídeos e de hexaminas, que estão presentes na parede celular de leveduras, não é necessária, pois são extraídas após o tratamento com base (NaOH 50%) e ácido forte (H₂SO₄ 50%), e descartadas após a centrifugação. Anteriormente, WAHLSTROM, V. L em 1987 [190], já tinha demonstrado isto em seus experimentos.

Os resultados, objetivando definir os níveis das variáveis independentes para a determinação das melhores condições de extração de glucanas, se encontram na Tabela 3 e 4 (análise de variância) e no Gráfico 1. A concentração de levedura utilizada nos experimentos foi de 25% (Peso Seco/v) em decorrência da viscosidade.

Tabela 3. Composição dos sólidos insolúveis obtidos após a extração da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*: Experimento 1.

Experimentos	Tratamento		Composição de sólidos insolúveis extraídos					
			Umidade	Proteína	Cinzas	Massa	Carboidratos/g	% de
	Final g%	g%	g%	seca /25g	extração			
	pH	T°C						
1	9	60	9,40	4,42	0,71	7,794	6,66	85,40
2	9	70	8,80	4,59	0,82	7,9985	6,86	85,70
3	9	80	6,30	4,43	1,91	7,8179	6,83	87,36
4	10	60	9,30	4,66	0,23	8,1481	6,99	82,41
5	10	70	9,90	4,87	1,80	8,8126	7,35	83,40
6	10	80	7,80	4,59	1,50	8,3515	7,19	86,09
7	11	60	8,00	4,54	2,41	8,1415	6,92	84,99
8	11	70	9,80	4,46	1,87	8,3033	6,94	83,58
9	11	80	9,10	4,59	0,19	7,9800	6,87	86,09

$$\text{Carboidratos /g} = [\text{umidade \%} + \text{Proteínas \%} + \text{cinzas \%}] - \text{Massa seca /25g}$$

Por outro lado, verifica-se na Tabela 4.(análise de variância) que houve diferença significativa para os efeitos linear e quadrático para pH ($P < 0,05$). No caso das interações não houve diferença significativa ($p < 0,05$). O modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,93188, por tanto reflete a adequação do modelo matemático aos dados experimentais.

Tabela 4. Análise de variância para a composição de sólidos insolúveis obtidos após a extração da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*: Experimento 1.

Fator		Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	F	P
PH	L+Q	2	0,241520	0,12076	16,00872	0,025076
Temp	L+Q	2	0,56067	0,28033	3,71629	0,154204
PH x Temperatura		2	0,11990	0,11990	1,58950	0,296531
Desvio da regressão		3	0,022630	0,007543		

Na Figura 2, pode-se observar as curvas de superfície de resposta dos efeitos da temperatura e do pH na extração de carboidratos totais dos sólidos insolúveis após extração da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

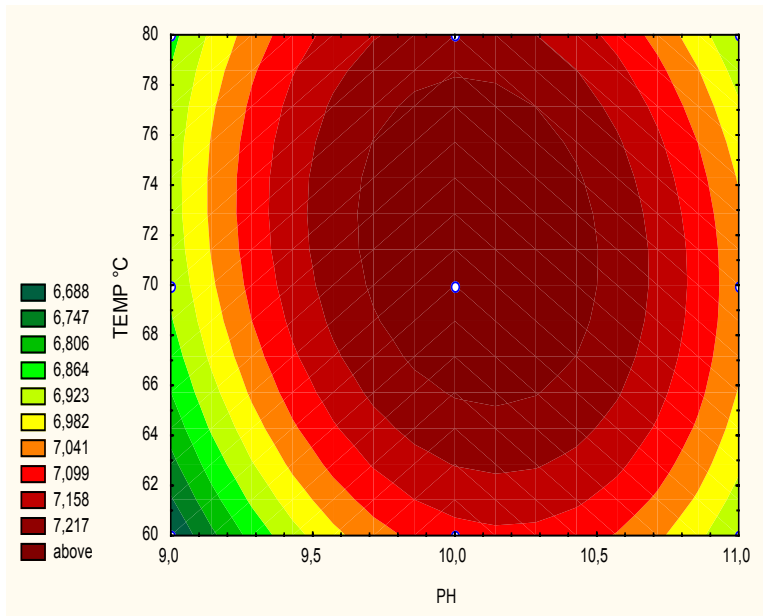


Figura 2. Efeito do pH e da temperatura no teor de carboidratos totais dos sólidos insolúveis após extração da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Observa-se na Figura 2, um rendimento maior de extração de carboidratos entre pH 9,5 e pH 10,75 diminuindo quando se afasta deste intervalo. Assim como a ação da temperatura, entre 60°C a 78°C o rendimento é maior, e diminui quando se afasta dessa faixa. Este resultado está diferente com o que MANNERS, D. J, 1976,[103], pois a extração foi realizada com pH 8,5 durante seis dias. OTERO, M. A, 1996 [127], realizou a extração com o pH 9,5 a 75°C durante duas horas, e apenas obteve o que ele chamou de “semi-glucanas”. REED [140] [, trabalhou com extração de parede celular e conseguiu bons rendimentos utilizando a temperatura de 80°C e 12% de NaOH durante uma hora de extração mas trabalhou com *Schizosaccharomyces pombe* . ASSIS, E.M, 1996 [9]; conseguiu seus melhores resultados com temperatura de 80°C e pH 11,0 durante 3 horas de processo. O rendimento da extração analisando apenas o maior resultado obtido de 7,35 g de carboidrato, foi de 29,4 % considerando o peso seco de massa seca inicial 25g.

Tabela 5. Composição dos sólidos insolúveis obtidos após a extração da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*: Experimento 2.

Exp.	Tratamento		Umidade Final g%	Proteína Final g %	Cinzas g%	Massa /g	Carboi- dratos/g	% de Extração
	Horas	T°						
1	3,0	60,0	6,0	3,850	0,35	5,467	4,915	89,90
2	3,0	80,0	7,3	4,250	0,27	5,9975	5,289	88,19
3	5,0	60,0	6,7	4,090	0,39	6,288	5,584	88,08
4	5,0	80,0	5,9	3,697	0,28	6,350	5,720	90,07
5	1,0	70,0	7,2	4,233	0,33	4,101	3,610	88,02
6	7,0	70,0	6,8	4,127	0,42	6,269	5,561	88,70
7	4,0	50,0	6,2	3,844	0,37	5,818	5,212	88,63
8	4,0	90,0	6,9	4,057	0,44	6,154	5,450	88,56
9	4,0	70,0	6,4	4,367	0,39	6,768	6,010	88,08
10	4,0	70,0	6,7	4,251	0,46	6,669	5,900	88,46

$$\text{Carboidratos /g} = [\text{umidade \%} + \text{Proteínas \%} + \text{cinzas \%}] - \text{Massa seca /25g}$$

A partir dos dados obtidos (Tabela 5) e a análise de variância (Tabela 6), verificamos que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no teor dos sólidos insolúveis que foram extraídos em função do tempo e da temperatura para um coeficiente de determinação (R^2) de 0,95857, com um desvio da regressão (“Lack of Fit”) não significativo de (0,1687), indicando que o modelo matemático elaborado a partir dos dados experimentais foi adequado. Foram elaboradas as curvas de superfície de resposta permitindo a visualização dos efeitos do tempo e da temperatura na extração de carboidratos totais em 25% de matéria seca (P/V). (Figura3).

Tabela 6. Análise de variância para a composição de sólidos insolúveis obtidos após a extração da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*: Experimento 2.

Fator		Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrad o médio	F	P
Tempo	L+Q	1	2,197464	0,12076	363,2172	0,033373
Temperatura	L+Q	1	0,81016	0,81016	13,3911	0,169823
Tempo x Temperatura		1	0,11990	0,11990	1,58950	0,368553
Lack of Fit		3	0,16870	0,56234	9,2949	

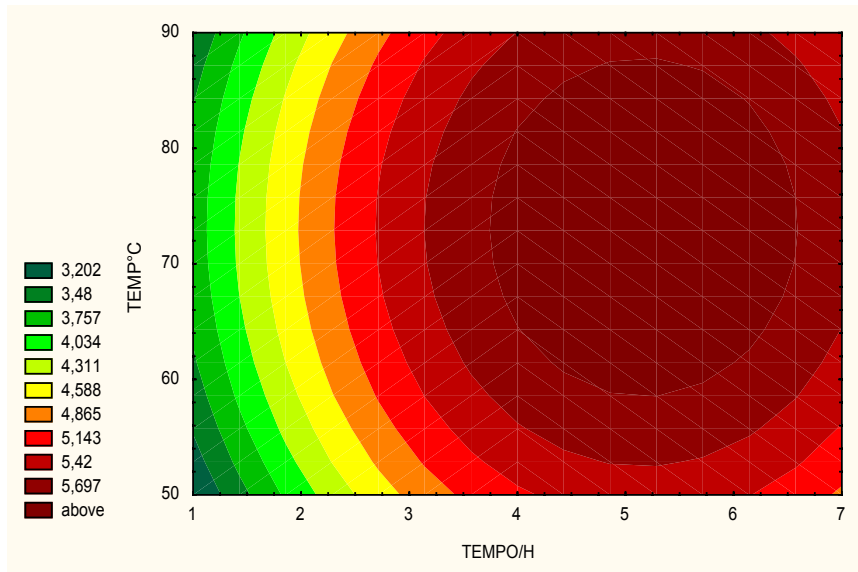


Figura 3. Efeito do tempo em horas e da temperatura em °C na obtenção de carboidratos totais da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Na figura 3, o tempo necessário para a obtenção de um maior rendimento de extração de carboidratos está na faixa entre 4,0 a 6,5 horas, diminuindo quando se afasta deste intervalo. A temperatura por sua vez ficou entre 60 a 87°C. A variação de tempo de extração encontrada por DZIEZAK, J. D, 1987 a e b [30, 31, 45, 103 e 122], HALÁSZ, A, 1991, MANNERS, D. J, 1976, NORTHCOTE, D. H, 1963 variou de 1 hora a 24 horas e temperatura de 60 a 100°C.

Análise de Carboidratos por RMN

Após os ensaios, onde foram definidos os parâmetros adequados de pH, temperatura e tempo para a obtenção de glucanas, foram obtidas duas amostras e enviadas para a Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, Departamento de Química, onde foi realizada a análise por Ressonância Magnética Nuclear para a caracterização dos carboidratos presentes.

A análise em espectro de ^{13}C RMN baseia-se nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono. Para a interpretação dos espectros é analisada a região de carbonos anoméricos, por exemplo C1 é aproximadamente δ 98-109 ppm, que comparada a literatura permite determinar ligações do tipo α ou β . Da mesma forma ligações do tipo (1-6) podem ser identificadas pelo valor do deslocamento químico do C - O - substituído na região aproximada de δ 60-67 ppm. Na literatura, os sinais em espectro de beta glucanas aparecem

com seis sinais de carbono a 102,70 (C1), 85,98 (C3), 76,14 (C5), 72,59 (C2), 68,23 (C4) e 60,70 (C6) ppm. A Figura 4. Refere -se as amostras enviadas para análise.

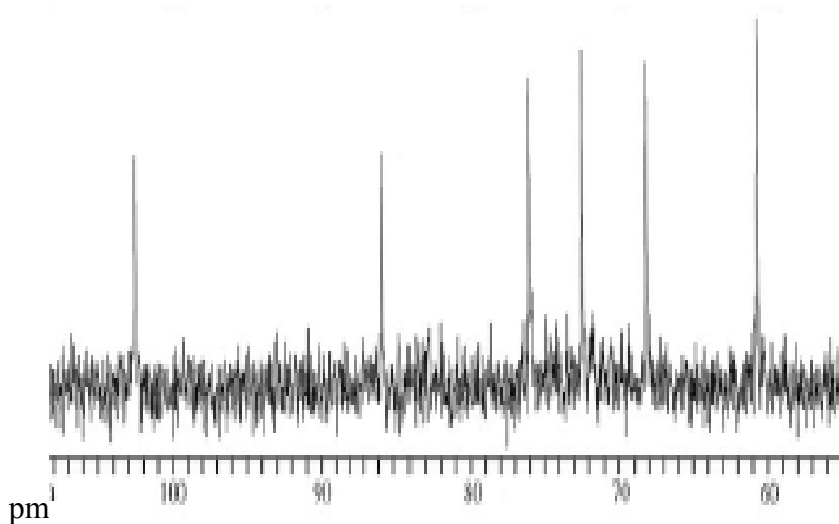


Figura 4. Amostra de carboidratos extraídas e enviadas para análise de RMN.

Pela análise da Figura 4, podemos notar a presença do sinal de carbono anomérico entre δ 102 e 103 ppm que pode ser correspondente ao C1 das unidades β -D -glucosídicas. Os carbonos anoméricos de α - glucanas encontram-se geralmente na região de δ 97 – 101,6 ppm e de β - glucanas em campo um pouco mais baixo δ 98,0-104,0 ppm. GORIN, 1988. A alta intensidade do sinal em δ 61,02 ppm é característico de C6 – O – não substituído, também encontrado por KOGAN, 1998 [83] e WILLIAM et al.,1991 [191]. Estes dados aliados à semelhança do perfil do espectro RMR ^{13}C da Figura 4 permite propor para a amostra analisada é uma fração representativa de uma β -D – glucana (1-3) e (1-6) .

Conclusão

A otimização do processo de extração de glucanas da parede celular de *S.cerevisiae* pode ser conseguida através de um baixo custo, utilizando a levedura descartada das usinas e de cervejarias, trabalhando com produtos químicos baratos (NaOH e H₂SO₄), com temperaturas entre 68-87°C; pH entre 9,7 e 10,5 em um período de tempo entre 4,5 a 6,0 horas. A extração das glucanas (1,3) Beta -D-glucana e (1,6) Beta D-Glucana foi confirmada através da análise de ¹³C Ressonância Magnética Nuclear. Apresentaram uma pureza média de extração de 88,66% e um rendimento em média de 29,0% em relação ao peso seco de levedura.

ARTIGO 2

**A AÇÃO HIPOCOLESTEROLÊMICA DE BETA GLUCANAS EXTRAÍDAS DA
PAREDE CELULAR DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

HEVENILTON J. MATIAZI

Resumo

O principal objetivo desta pesquisa foi estudar a influência da adição na ração para ratos, de 10 % de beta glucanas extraídas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, à uma dieta com 10 % de gordura de coco (hipercolesterolêmica) com a qual se alimentaram ratos Wistar durante 30 dias, sendo divididos em quatro grupos: um controle alimentado com ração comercial comum, outro com ração comercial contendo 10% de gordura de coco, um terceiro com a ração comercial complementada com 10% de gordura de coco mais 10% de Beta-glucana e um último grupo que foi alimentado com ração comum acrescentada com 10% de Beta-glucana. Após o período experimental, foram colhidas amostras de sangue e analisadas para determinar o nível de colesterol total. Os resultados foram submetidos a análises de variância. Verificou-se que houve diferença significativa para a ração com complemento de 10% de gordura de coco, mostrando que este tratamento realmente causou aumento nos níveis de colesterol sanguíneo. Por outro lado, o grupo tratado com Beta-glucana mostrou uma tendência a diminuir o colesterol basal dos animais (tendência de redução). Não houve diferença estatisticamente significativa no teor de colesterol basal entre a ração comercial e a ração contendo beta glucana e gordura de coco, indicando que a beta glucana foi capaz de manter ou evitar o aumento de colesterol basal dos animais.

Summary

The main objective of this research was to study the influence of the glucan addition of 10 % of beta extracted of the cellular wall of *Saccharomyces cerevisiae*, in a diet with 10 % of coconut fat (hipercholesterolemic) with which if had fed Wistar rats during 30 days, being divided in four groups: a control fed with common commercial ration, another commercial ration I contend 10% of coconut fat, one third a commercial ration was complemented with 10% of fat of coconut more 10% of Beta-glucan and a last group that was fed with added common ration with 10% of Beta-glucan. After the experimental period, had been harvested samples of blood and analyzed to determine the total cholesterol level. The results had been analyzed using analyze of variance. We can verify that it had significant difference for the ration with complement of 10% of coconut fat, showing that this treatment really caused increase in the sanguineous cholesterol levels. On the other hand, the group dealt with Beta-glucan showed a trend to diminish the basal cholesterol of the animals (reduction trend). It did not have statistic significant difference in the basal cholesterol text between the commercial ration and the ration I contend glucana beta and fat of coconut, indicating that the glucana beta was capable to keep or to prevent the basal cholesterol increase of the animals..

Introdução

Na literatura podemos encontrar diversos trabalhos descrevendo a ação hipocolesterolêmica de beta glucanas na dieta de animais de laboratórios e de populações. A maioria dos trabalhos são realizados utilizando cereais que apresentam Beta-glucanas na sua composição, como por ex: aveia, centeio, etc, ou de beta glucanas isoladas destes mesmos cereais. [186, 15 e 115] estudaram a ação de aveia na diminuição dos níveis de colesterol e a ação hipoglicêmica em populações comprovando que este efeito era decorrente da ação de betas glucanas presentes neste cereal. Outros autores, CHEM, W.J.L.; ANDERSON, J.W ,1996 [18], trabalhando com Beta-glucanas extraídas do cogumelo *Volvariella volvacea*, demonstraram a ação hipocolesterolêmica deste composto . PÁDUA , A. E, et al.[129], estudaram a ação da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre ratos Wistar através de dieta hipercolesterolêmica e verificaram redução nos níveis de triacilgliceróis séricos, contudo não viram influência nas concentrações de lipídios e de colesterol totais.

O objetivo desta pesquisa foi estudar a influência da adição de beta glucanas extraídas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, nos níveis de colesterol sanguíneo em ratos Wistar alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica.

Materiais e Métodos

Material.

Creme de Levedura: A creme de levedura contendo *Saccharomyces cerevisiae* foi fornecido pelas usinas de açúcar e álcool da região norte do Paraná.

Ratos: Foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, livres de patógenos específicos (SPF), pesando em média 287 g no início do experimento, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Pr.

Ração comum: Composição em 100g:- proteínas – 12,5g; óleo de soja 7,0g; celulose 4,0g; mistura salina 4,0 g; mistura vitamínica 1,0 g, amido de milho q.s.p 100.

Métodos

Extração das Beta-glucanas:

A beta glucana utilizada nesta pesquisa foi extraída da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente dos cremes de leveduras obtidas de usinas de açúcar e álcool. Esta foi centrifugada a 6000 rpm, temperatura ambiente (25°C) e as células obtidas lavadas três vezes com água destilada, concentrando-as até a obter um teor de sólidos de 25% (P/V). Esta suspensão foi autolisada a 49°C por 8,0 horas segundo Martins, A, 2000. Após este período, a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores descartando o sobrenadante. Os sólidos, ou parede celular, obtidos foram lavados três vezes com água destilada, recuperado-os por centrifugação utilizando as mesmas condições anteriormente mencionadas. Os sólidos assim obtidos, foram ressuspensos em água destilada. e o pH corrigido para 9,5 com NaOH 50% e aquecida a 70°C por 5,0 horas. Em seguida a suspensão foi acidificada até pH 5,0 com H₂SO₄ 50%, centrifugada e lavada mais três vezes como anteriormente. Os sólidos foram secados a 40°C por 4 horas em estufa.

A caracterização bioquímica das Beta-glucanas obtidas, foi realizada utilizando Ressonância Magnética Nuclear ¹³C (MRN).

Determinação do Colesterol Total:

O método utilizado para a determinação de colesterol total foi descrito por HUANG et al, 2000 . A determinação se baseia na reação de Liebermann-Burchard que implica na desesterificação enzimática do colesterol pela colesterol esterase e a oxidação do colesterol livre pela colesterol oxidase, com formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂ forma com o reagente fenol –4 –aminoantipirina o cromóforo antipirilquinonimina, cuja cor vermelha absorve a 500 nm . Utilizou-se Kit fornecido pelo Laboratório “ Lab Imagem Londrina”, que também realizou as análises.

Ensaio com Ratos:

Foram utilizados quatro tratamentos com as seguintes características: tratamento A – Controle com Ração Comercial 20 g ; tratamento B – Ração Comercial, 18 g , Óleo de Coco, 2 g (10 %); tratamento C – Ração Comercial, 18 g, β – glucana, 2 g (10%); tratamento D – Ração Comercial, 16 g,, Óleo de Coco, 2 g (10 %), β – Glucana, 2 g (10 %).

Foram utilizados 44 ratos (11 por tratamento) que foram mantidos em gaiolas metabólicas, individuais, recebendo água *ad libitum*. A duração do experimento foi de 30 dias, com um período de adaptação aos tratamentos de 5 dias.

Foram determinados os pesos iniciais, consumo alimentar, ganho de peso, peso final e concentração de colesterol total no sangue. No final do ensaio, os ratos foram anestesiados para retirada de amostras de sangue por punção cardíaca, para a determinação do colesterol sanguíneo.

Resultados e Discussão

Peso Inicial

Os resultados relativos ao peso inicial dos ratos submetidos aos tratamentos são mostrados na Tabela 1. A análise de variância foi realizada para verificar se os pesos iniciais dos ratos estavam próximos, se algum já era obeso ou estava muito abaixo do peso em relação aos outros, o que poderia influenciar nos resultados.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos pesos iniciais dos ratos.

Tratamentos	A	B	C	D
Média/g	293,4545	286,7272	288,7272	278,1818
Desvio Padrão	28,984	25,865	18,853	15,986

A- Ração Comercial; B – Ração Comercial e 10% Coco; C – Ração Comercial e 10 % β - glucana ; D – Ração comercial + Coco10 % + β –Glucana 10 %.

A análise de variância dos resultados dos pesos iniciais dos ratos indicou um valor de $p = 0,4770$, que permite afirmar que as alterações que ocorreram durante o experimento nos diferentes tratamentos em relação às alterações dos níveis de colesterol e de peso, foram em decorrência apenas às dietas oferecidas.

Consumo inicial e final de ração

Nas tabelas 2 e 3 foram analisados o consumo da ração inicial e final dos ratos nos diferentes tratamentos, foi empregada a análise de variância para se determinar as médias de consumo.

Tabela 2 . Efeitos do complemento de beta glucana (10%) e de gordura de coco no consumo inicial de ração por ratos da linhagem Wistar.

Tratamentos	A	B	C	D
Média/g	14,7272	19,272	9,8181	20
Desvio Padrão	7,760	2,412	8,784	0,0

A- Ração Comercial; **B** – Ração Comercial e 10% Coco; **C** – Ração Comercial e 10 % β - glucana ; **D** – Ração comercial + Coco10 % + β –Glucana 10 %.

Consumo Final de Ração

Tabela 3. Efeitos do complemento de beta glucana (10%) e de gordura de coco no consumo final de

ração por ratos da linhagem Wistar.

Tratamentos	A	B	C	D
Média	26,363	21,454	22,545	20,0
Desvio Padrão	3,668	1,572	3,475	1,662

A -Ração Comercial; **B** – Ração Comercial e 10% Coco; **C** – Ração Comercial e 10 % β - glucana ; **D** – Ração comercial + Coco10 % + β –Glucana 10 %.

Na análise de variância do dados de consumo inicial de ração, indicaram que os ratos dos tratamentos B e D consumiram uma quantidade significativamente maior ($p < 0,05$) de

ração com relação aos outros tratamentos. Porém, na análise de variância de consumo final da ração não houve diferença significativa para nenhum dos tratamentos. De acordo com a tabela 2, a ingestão maior de ração ocorreu no início do experimento, provavelmente pela melhor palatabilidade que a gordura de coco proporcionou aos ratos, o mesmo foi relatado por Misaki, ^a [115].

Na tabela 3, pode-se verificar que com relação ao consumo final, a ingestão de menor quantidade de ração por parte dos ratos do tratamento B, provavelmente ocorreu devido ao fato da ração ser hipercalórica e assim sendo, o animal se saciava rapidamente com menor quantidade ingerida.

Ganho de Peso dos Ratos.

Tabela 4. Influência do complemento de beta glucana (10%) e de gordura de coco no ganho de peso dos ratos da linhagem Wistar.

Tratamentos	A	B	C	D
Média/g	63,818a	105,09b	61,9090a	75,6363a
Desvio Padrão	26,313	17,398	17,335	11,272

A -Ração Comercial; **B** – Ração Comercial e 10% Coco; **C** – Ração Comercial e 10 % β - glucana ;

D – Ração comercial + Coco10 % + β -Glucana 10 %. Letras diferentes significa que houve diferença significativa ($p < 0,05$).

Analisando a tabela 4, verifica-se que houve diferença significativa apenas no tratamento B (ração com complemento de gordura de coco). Os ratos tiveram um aumento substancial em seu peso. Devido ser uma dieta muito calórica e hipercolesterolêmica, já o tratamento D (ração com complemento de 10% de Beta-glucana com 10% de côco), o ganho de peso não foi tão acentuado, ficando dentro da média do tratamento A (ração comercial) e do tratamento C (ração comercial complementada com 10% de Beta-glucana). Estes tratamentos não aumentaram significativamente o peso dos ratos, sendo a menor media encontrada no experimento. Isto se deve provavelmente a ação equivalente à das fibras nos alimentos (sensação de saciedade) que as beta glucanas apresentam como característica

Determinação de Colesterol.

Análise de Colesterol Total.

Tabela 5. Efeitos do complemento de beta glucana (10%) e de gordura de coco no colesterol total de ratos da linhagem Wistar.

Tratamentos	A	B	C	D
Média/g	94,090a	119,454b	91,454a	98,8181a
Desvio Padrão	23,565	10,492	13,041	12,164

A -Ração Comercial; **B** – Ração Comercial e 10% Coco; **C** – Ração Comercial e 10 % β - glucana ;

D – Ração comercial + Coco10 % + β -Glucana 10 %. Letras diferentes significa que houve diferença significativa

Na tabela 5, podemos verificar que houve diferença significativa para a ração B com complemento de 10% de gordura de coco, mostrando que este tratamento realmente causou aumento nos níveis de colesterol sanguíneo. E podemos ver que a beta glucana tende a diminuir o colesterol basal dos animais (tendência de redução). Não há diferença estatisticamente significativa entre a ração comercial e beta glucana e coco, e isto indica que a beta glucana é capaz de reduzir , ou evitar o aumento de colesterol induzido pela gordura de coco. Assim, a Beta glucana é capaz de reduzir a níveis semelhantes ao do controle o colesterol de animais com dietas hipercolesterolêmica. Essa resultado confirma as expectativas de que a beta glucana pode abaixar significativamente os níveis séricos de colesterol em ratos submetidos a dietas supostamente hipercolesterolêmica, como se tem observado para outros tipos de fibra solúvel como a goma guar , Fisher, 1998 [42], farelinho de aveia e aveia integral KIRBY, R. W, 1981, e outras formas de fibra solúvel como pectina e Psyllium, CHEM, W. J.L, 1981 [18] e WATTERS, K 1989.[186 e 187]

Conclusões:

Houve diferença significativa para a ração com complemento de 10% de gordura de coco, mostrando que este tratamento realmente causou aumento nos níveis de colesterol sanguíneo.

O grupo tratado com Beta-glucana mostrou uma tendência a diminuir o colesterol basal dos animais (tendência de redução)

Não houve diferença estatisticamente significativa no teor de colesterol basal entre a ração comercial e a ração contendo beta glucana e gordura de coco, indicando que a beta glucana foi capaz de manter ou evitar o aumento de colesterol basal dos animais.

ARTIGO 3

Efeitos da β -glucana na clastogenicidade e teratogenicidade causadas pela exposição aguda à ciclofosfamida em camundongos

Hevenilton José Matiazi

Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil.

Resumo

Alterações que podem levar ao desenvolvimento do câncer podem também estar relacionadas ao desenvolvimento adverso da prole de animais experimentais. Alguns alimentos funcionais, que possuem na sua constituição o polissacarídeo β -glucana, estão descritos como eficientes na prevenção de danos clastogênicos. Diante deste fato a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a eficiência deste polímero de açúcar no controle de danos mutagênicos e teratogênicos. Dois lotes de fêmeas, prenhes e não prenhes, foram avaliados. A análise dos resultados indicou que a β -glucana foi eficiente em prevenir danos clastogênicos tanto em fêmeas prenhes como nas não prenhes. Demonstrou ainda que as fêmeas grávidas parecem ser mais susceptíveis aos danos mutagênicos. No entanto, os efeitos teratogênicos não foram prevenidos de forma eficiente, mas uma tendência à redução da taxa de malformações foi evidenciada. Outro resultado importante foi que apesar da β -glucana não ter prevenido as malformações ela mostrou-se muito eficiente no aumento da viabilidade fetal e redução das taxas de perda pós-implantacional e reabsorção demonstrando assim uma melhora do desempenho reprodutivo das fêmeas. No entanto, verifica-se que a β -glucana possui baixo potencial na prevenção de malformações, mas é uma forte candidata a ser utilizada na prevenção de danos genéticos e como adjuvante nas quimioterapias às quais pacientes oncológicos são submetidos.

Palavras-chave: β -glucana, ciclofosfamida, teratogenicidade, antimutagenicidade.

Summary

Alterations that can lead to the development of the cancer can also be related to the adverse development of the offspring of experimental animals. Some functional foods, that possess in its constitution the β -glucan polymer, are described as efficient in the prevention of mutation damages. Ahead of this fact the present research had for objective to evaluate the efficiency of this polymer of sugar in the control of drugs mutation and teratogenic damages. Two lots of females, pregnant and not pregnant, had been evaluated. The analysis of the results indicated that the β -glucan was efficient in such a way preventing clastogenics damages in pregnant females as in the not pregnant ones. It still demonstrated that the pregnant females seem to be possible to the mutagenics damages. However, the teratogenics effect had not been prevented of efficient form, but a trend to the reduction of the tax of malformations was evidenced. Another important result was that despite the β -glucan not having prevented the malformations it very revealed efficient in the increase of the fetal viability and reduction of the taxes of loss after-implantation and reabsorption thus demonstrating an improvement of the reproductive performance of the females. However, it is verified that the b-glucan possess low potential in the prevention of malformations, but is one strong candidate to be used in the prevention of genetic damages and as adjuvant in the drugs treatment to the which oncologic patients they are submitted.

1. Introdução

Eventos mutagênicos e teratogênicos estão relacionados, uma vez que ambos decorrem de alterações fixadas no DNA. Estas alterações levam à mudanças no padrão da expressão gênica que acarretam fenótipos adversos provenientes de alterações, principalmente, nos eventos de mitose envolvidos no processo de crescimento, morfogênese e diferenciação celular entendida aqui como maturação dos processos fisiológicos.

Os fatores genéticos constituem a causa mais comum de malformações congênitas, sendo responsáveis por cerca de um terço dos casos na espécie humana (MOORE & PERSAUD, 2004)[119]. Estimativas da incidência das causas de malformações congênitas primárias destacam as aberrações cromossômicas como responsáveis por 6-7%, genes mutantes por 7-8%, fatores ambientais por 7-10%, herança multifatorial por 20-25% e 50-60% de etiologia desconhecida (CONNOR & FERGUSON-SMITH, 1987; PERSAUD, 1990; THOMPSON et al., 1991)[23, 38, 119 e 171]. No entanto, é provável que a maioria das crianças com malformações congênitas de etiologia desconhecida tenha algum distúrbio genético (MOORE & PERSAUD, 2004)[119].

Além da associação entre eventos mutagênicos e teratogênicos pode-se ainda inferir que esses se relacionam com outros eventos capazes de iniciar o desenvolvimento de cânceres. Relacionados estes três processos biológicos entende-se que o aumento crescente de resíduos industriais, agrônômicos, domésticos e urbanos, advindos de ações antropogênicas, podem estar relacionado ao aumento de tais eventos nas populações humanas. Assim, tornam-se cada vez mais necessários testes genéticos que possam medir os riscos impostos às populações e que possibilitem encontrar agentes naturais e/ou artificiais capazes de minimizar e/ou impedir estes danos.

Como vários estudos indicam uma associação inversamente proporcional entre o consumo de verduras e frutas e o desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer (FERGUSON, 1994; FLAGG et al., 1995) [38 e 43], pode-se pensar em testar substâncias presentes neste tipo de dieta, para se determinar a relevância desses compostos, na prevenção de efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos.

A molécula de β -glucana, objeto de estudo da presente pesquisa, é um polímero de D-glicose que possui em seu esqueleto linear central ligações na posição β -(1 \rightarrow 3). Esta molécula possui ainda ramificações contendo ligações β -(1 \rightarrow 6) (Di LUZIO et al, 1979) [28].

Nenhuma referência da utilização de β -glucana em testes de prevenção de teratogenicidade foi encontrada na literatura consultada. No entanto, estudos destacam sua

capacidade de prevenção de danos clastogênicos e genotóxicos frente à ciclofosfamida, cisplatina, doxorubicina e peróxido de hidrogênio (SLAMENOVÁ et al., 2003; TOHAMY et al., 2003; LIN et al., 2004) [156, 174 e 92]. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da β -glucana na prevenção da teratogenicidade causada por exposição aguda à ciclofosfamida e a sua capacidade antimutagênica em fêmeas prenhes e não prenhes.

2. Material e Métodos

2.1. Agente indutor de danos no DNA e teratogêno

Para a indução de danos no DNA e teratogênese utilizou-se o agente alquilante, de ação indireta, ciclofosfamida (Sigma), na concentração final de 20,0 mg/Kg (via intraperitoneal, i.p.), diluído em solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7,4. Este quimioterápico e imunossupressor tem sua ativação realizada principalmente no fígado e seus metabólitos provocam potente ação mutagênica e teratogênica.

2.2. Extração e preparação da β -glucana

O procedimento de extração foi realizado através da autólise de *Saccharomyces cerevisiae*. A parede celular foi separada através de centrifugação em 6500 G/8min e tratada à quente (70°C em 5 horas) em meio alcalino com NaOH (50%), lavada e centrifugada três vezes e finalmente secada em estufa a 40°C. Foi realizada análise em RMN (cromatografia por ressonância magnética nuclear), comprovando-se a presença de (1,3 e 1,6) β -D-glucana com pureza de 85% e, em seguida, solubilizando-se a glucana, utilizando-se DMSO (dimetil sulfóxido) mais uréia 8M, na proporção de 100mL:60g. Levou-se ao banho-maria, acrescentando-se 100ml de DMSO com 10mL de ácido sulfúrico concentrado e permanecendo em agitação por 4 horas a 100°C. Fez-se então a diálise com aproximadamente 100 litros de água ultra-pura (Milli-Q) e concentrou-se a solução em um evaporador rotativo a 40°C para a posterior liofilização.

A solução de β -glucana foi preparada em PBS livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7,4 e estéril. A concentração final utilizada foi de 150mg/Kg de peso (i.p.).

2.3. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)* de ambos os sexos (60 fêmeas e 20 machos), em idade reprodutiva, com peso médio de 30g, provenientes do Biotério Central

da Universidade Estadual de Londrina. O experimento foi conduzido no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno, em dupla no caso das fêmeas e isolados no caso dos machos. Passaram por um período mínimo de adaptação correspondente a sete dias. A luminosidade e temperatura foram controladas, para tanto utilizou-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro) com temperatura mantendo-se em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. A alimentação foi constituída de água filtrada e ração comercial, *ad libitum*.

As fêmeas foram divididas em dois lotes. O primeiro deles composto por 40 animais que foram submetidos ao cruzamento *overnight*, na proporção de 1 macho: 2 fêmeas, para avaliação da teratogenicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade. A detecção da prenhez foi feita através da observação do *plug* vaginal, sendo este dia considerado o dia zero de gestação. E o segundo com 20 fêmeas, não prenhes, que serviram para o estudo de mutagenicidade e antimutagenicidade.

2.4. Ensaio de teratogenicidade

O primeiro lote, de fêmeas prenhes (n=40), foi subdividido em 4 grupos experimentais (n=10).

Os animais do grupo controle (Grupo 01) receberam PBS, livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7,4 e estéril, no volume de 0,1mL/10g de peso corpóreo, via intraperitoneal (i.p.), no 9º, 10º e 11º dias gestacionais. Os animais do grupo ciclofosfamida (Grupo 02) receberam este quimioterápico na concentração de 20mg/kg de peso corpóreo (i.p.) no 10º dia gestacional. Os animais do grupo β -glucana (Grupo 03) receberam este polissacarídeo no 9º, 10º e 11º dias gestacionais na concentração de 150mg/kg de peso corpóreo (i.p.). Já os animais pertencentes ao grupo associado (Grupo 04) receberam 150mg/kg de peso corpóreo (i.p.) de β -glucana, nos 9º, 10º e 11º dias gestacionais, e 20mg/kg de peso corpóreo de (i.p.) de ciclofosfamida no 10º dia gestacional.

O período gestacional prolongou-se até o 18º dia, quando as fêmeas foram submetidas à eutanásia, por deslocamento cervical, para a realização das laparotomias, já que recém-nascidos malformados ou com baixa viabilidade são frequentemente canibalizados pelas genitoras.

Para avaliação de possíveis efeitos materno-tóxicos foram inspecionadas as vísceras para detecção de anormalidades macroscópicas. Em seguida, coletou-se e pesou-se o pulmão, coração, fígado e rins.

Procedeu-se, então, a histerectomia e onfalectomia, registrando-se número de sítios de implantação, presença de reabsorções, número de fetos vivos e mortos, peso fetal e placentário. Fez-se ainda uma análise sistemática para detecção de malformações externas e sexagem. Com estes dados calculou-se os parâmetros relativos à fertilidade: Taxa de reabsorção (n° de reabsorções \times 100 / n° de implantações); Taxa de perdas pós-implantacional (n° de implantações – n° de fetos vivos \times 100 / n° de implantações); Índice placentário (peso placentário / peso fetal); Taxa de malformações externas (n° de fetos malformados \times 100 / n° fetos analisados).

Fez-se também a adequação do peso à idade da prenhez segundo a metodologia de Calderon (1998). Para este autor, os fetos podem ser classificados como: fetos com peso adequado para a idade de prenhez (PAIP) – peso compreendido entre a média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos de baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) – peso corporal inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; fetos acima do peso para a idade de prenhez (APIP) – peso corporal superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo.

A prole dos grupos foi dividida, aleatoriamente, em dois subgrupos compostos cada um por 50% da ninhada. O primeiro foi fixado em solução de Bodian's e destinado à análise visceral. Esta análise fez-se através de cortes/microdissecção proposta por Barrow & Taylor (1969) [12] para o estudo de tórax e abdômen e pelos cortes estratégicos propostos por Wilson (1965) para estudo de cabeça. A classificação das alterações viscerais baseou-se, principalmente, nos trabalhos de Taylor (1986)[192] e Manson & Kang (1994) [170] e alterações propostas por Oliveira (2001)[125]. O segundo subgrupo foi destinado à análise esquelética através da técnica de *Alizarina red* descrita por Staples & Schnell (1964)[174]. Os exames das vísceras e esqueletos fetais foram realizados em lupa estereomicroscópica. Para a comparação dos resultados quantitativos foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos (ANOVA, Kruskal-Wallis e Qui-quadrado), conforme a natureza da distribuição dos dados. Os dados qualitativos e as frequências, conforme recomenda a literatura especializada (MANSON et al., 1982; HANSEMAN & HOGAN, 1975) [99 e 57], tiveram a ninhada utilizada como unidade-base. Em todos os casos, quando $p < 0,05$, a diferença foi considerada estatisticamente significativa.

2.5. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Os grupos experimentais, do primeiro lote, foram submetidos à coleta de sangue periférico, para avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade, através de punção da veia caudal em 4 diferentes momentos. As coletas de sangue designadas pelos momentos T0, T1, T2 e T3 foram realizadas no 9º, 10º, 11º e 12º dias gestacionais, respectivamente. As coletas aconteceram sempre antes da administração das drogas (tratamentos).

O segundo lote, de fêmeas não prenhes (n=20), foi subdividido em 4 grupos experimentais (n=5) e os tratamentos realizados foram idênticos àqueles descritos para o lote anterior. Estes animais foram submetidos à coleta de sangue periférico, para avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade, através da punção da veia caudal em 4 diferentes momentos com intervalos de 24 horas (T0, T1, T2 e T3) realizados em 4 dias consecutivos sempre antes da administração das drogas.

Para a avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade utilizou-se a técnica de micronúcleo em sangue periférico descrita por Hayashi e cols. (1990). Para tanto, uma gota de sangue periférico foi depositada em uma lâmina previamente preparada com uma camada de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Cobriu-se a mesma com uma lâminula e estas permaneceram em *freezer* (-20°C) por um período mínimo de 48 horas. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488nm) e filtro alaranjado, em objetiva de 100 vezes.

Analisou-se 2000 células/animal e a estatística foi realizada através do teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

A porcentagem de redução dos danos do agente mutagênico pela β -glucana foi calculada através da média do número de células com danos observadas no agente indutor de danos (ciclofosfamida) menos o número de células com danos observados no tratamento de antimutagenicidade (β -glucana + ciclofosfamida) x 100, dividido pelo número de células com danos observadas no agente indutor de dano menos o número de células com danos do controle (PBS).

3. Resultados

3.1. Ensaio de teratogenicidade

Na Tabela 01 verifica-se o peso inicial, peso final e ganho de peso durante o período de tratamento. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos nos dois diferentes lotes de animais (fêmeas prenhes e não prenhes).

Tabela 01 – Peso inicial, final e ganho de peso durante o período de tratamento.

Tratamento	Fêmeas prenhes			Fêmeas não prenhes		
	PI	PF	GP	PI	PF	GP
Grupo 01	36,08±5,49 _a	40,44±6,87 _a	4,37±2,55 ^a	34,18±4,79 _a	37,41±5,85 _a	3,22±3,11 ^a
Grupo 02	35,55±3,88 _a	39,08±4,62 _a	3,54±1,91 ^a	35,59±6,96 ^a	36,41±8,12 _a	0,82±2,43 ^a
Grupo 03	35,23±4,09 _a	38,06±4,67 _a	2,82±2,00 ^a	33,77±2,10 _a	36,91±2,99 _a	3,14±1,51 ^a
Grupo 04	37,74±4,55 _a	39,58±5,04 _a	2,11±2,80 ^a	31,78±3,55 _a	32,92±3,00 _a	1,14±0,87 ^a

Legenda: PI – peso inicial; PF – peso final; GP – ganho de peso (PF – PI). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. (Teste: Análise de Variância / Tukey; $p < 0,05$).

O peso de órgãos como coração, pulmões, fígado e rins das fêmeas referentes ao lote 01 (animais prenhes) estão apresentados na Tabela 02. A análise destes dados indicou diferença estatisticamente significativa somente para fígado, sendo observado diminuição na média do peso dos fígados dos animais que receberam a ciclofosfamida (grupo 02).

Tabela 02 – Peso dos órgãos das fêmeas ao final do período gestacional.

Tratamento	Peso (g)			
	Coração ¹	Pulmões ²	Fígado ²	Rins ²
<i>Grupo 01</i>	0,20±0,05 ^a	0,21±0,03 ^a	2,61±0,64 ^a	0,41±0,08 ^a
<i>Grupo 02</i>	0,17±0,04 ^a	0,29±0,31 ^a	2,01±0,30 ^b	0,41±0,11 ^a
<i>Grupo 03</i>	0,20±0,04 ^a	0,22±0,02 ^a	2,60±0,40 ^a	0,42±0,08 ^a
<i>Grupo 04</i>	0,19±0,05 ^a	0,22±0,05 ^a	2,58±0,43 ^a	0,39±0,06 ^a

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. (Teste: ¹Kruskal-Wallis / Dunn; ²Análise de Variância / Tukey; p<0,05).

A Tabela 03 apresenta os parâmetros relativos à fertilidade e desenvolvimento fetal. A análise estatística demonstrou que não houve diferenças significativas para o número de implantes, número de fetos vivos, razão sexual e índice placentário.

Tabela 03 – Parâmetros relativos à fertilidade e desenvolvimento fetal.

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Nº de implantes</i> ¹	11,10±3,31 ^a	12,80±3,26 ^a	10,30±3,65 ^a	12,90±2,78 ^a
<i>Fetos vivos</i> ¹	8,90±3,28 ^a	4,50±3,84 ^a	8,00±3,13 ^a	7,70±4,97 ^a
<i>Viabilidade fetal</i> ¹	100,0±0,00 ^a	65,71±44,29 ^b	100,00±0,00 ^{a,b}	92,20±17,16 ^{a,b}
<i>TPPI</i> ²	8,68±14,84 ^a	70,56±33,57 ^b	16,89±18,20 ^a	31,70±36,17 ^{a,b}
<i>TR</i> ²	8,68±14,84 ^a	62,34±32,40 ^b	16,13±16,96 ^a	30,96±35,71 ^{a,b}
<i>Razão Sexual</i> ²	71,7±87,9 ^a	62,5±75,0 ^a	98,7±101,4 ^a	90,7±69,3 ^a
<i>PP (g)</i> ¹	0,12±0,02 ^a	0,04±0,01 ^b	0,12±0,02 ^a	0,11±0,16 ^{a,b}
<i>IP</i> ²	0,08±0,02 ^a	0,07±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a
<i>Peso fetal (g)</i> ¹	1,44±0,19 ^a	0,65±0,04 ^b	1,38±0,15 ^a	0,67±0,11 ^b
<i>CF (cm)</i> ¹	2,59±0,18 ^a	1,61±0,09 ^b	2,56±0,13 ^a	1,61±0,14 ^b
<i>APIP</i>		<i>BPIP</i>	<i>PAIP</i>	<i>BPIP</i>

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. TPPI – Taxa de perdas pós-implantacionais; TR – Taxa de reabsorção; PP – Peso placentário; IP – Índice placentário; CF – Comprimento fetal; APIP – Adequação do peso à idade de prenhez; PAIP – recém nascidos de peso adequado para a idade de prenhez; BPIP – recém nascidos com baixo peso para a idade de prenhez. (Teste: ¹Análise de Variância / Tukey; ²Kruskal-Wallis / Dunn; p<0,05).

A análise da viabilidade fetal demonstrou redução no grupo que recebeu ciclofosfamida (grupo 02), e a associação da β -glucana a este quimioterápico (grupo 04) auxiliou no aumento desta. A administração da β -glucana promoveu um acréscimo de aproximadamente 26,5% na viabilidade fetal, e esta expressiva porcentagem iguala o grupo 04 ao grupo controle (grupo 01). Verificou-se ainda que a administração da β -glucana, isoladamente, não interfere nos resultados deste parâmetro.

O mesmo raciocínio desenvolvido para a viabilidade fetal foi verificado também para as taxas de perdas pós-implantacionais e de reabsorção, ou seja, a ciclofosfamida causou um aumento das referidas taxas e a associação da β -glucana ao quimioterápico demonstrou uma melhora destes parâmetros.

O peso da placenta apresentou-se diminuído no grupo 02 em relação aos demais. O peso e o comprimento fetal mostraram-se diminuídos nos dois grupos que receberam a ciclofosfamida, independentemente da associação da β -glucana. A análise da adequação do peso à idade de prenhez demonstrou que os dois grupos que receberam ciclofosfamida apresentaram fetos de baixo peso para a idade gestacional. Já os fetos do grupo 03 não sofreram nenhuma alteração neste parâmetro. Auxiliam na compreensão deste fato os comprimentos dos fetos os quais também se mostraram alterados somente naqueles grupos que receberam a ciclofosfamida.

Na Tabela 04 estão apresentadas as anormalidades externas e variações encontradas em polo cefálico. A análise dos dados demonstra que a β -glucana não causou nenhuma alteração na progênie das fêmeas tratadas com esta molécula, segundo o protocolo estabelecido. No entanto, a associação desta à ciclofosfamida não demonstra diferenças estatisticamente significativas quando comparada à ciclofosfamida. Verifica-se somente uma tendência à redução das porcentagens de malformações, tanto em olhos (grupo 02 = 90,2%; grupo 04 = 58,8%) como naquelas relacionadas à alterações da porção mais proximal da calota craniana (grupo 02 = 75,4%; grupo 04 = 45,8%). A associação da β -glucana à ciclofosfamida também demonstrou redução da porcentagem de alterações em maxila, mandíbula e língua (grupo 02 = 72,9%; grupo 04 = 53,1%), e um aumento de alterações em fendas lábio-palatais (grupo 02 = 5,00% ; grupo 04 = 9,26%). Para as alterações de orelha verificaram-se valores semelhantes (grupo 02 = 38,7%; grupo 04 = 38,4%).

Tabela 04 – Anormalidades externas e variações encontradas em polo cefálico na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Polo cefálico – Terço superior				
Cabeça				
<i>Número de Fetos</i>	42	13	38	35
<i>Analizados</i>				
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	4	38	17
<i>Leve</i>	0	0	0	0
<i>Exencefalia Moderada</i>	0	1	0	1
<i>Severa</i>	0	2	0	6
<i>Acrania Real</i>	0	0	0	6
<i>Displasia Ectodérmica</i>	0	6	0	8
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	9^{a*}	0	18^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	75,4±17,5	0,00±0,00	45,8±43,8
Olhos				
<i>Exoftalmia Unilateral</i>	0	0	0	3
<i>Bilateral</i>	0	8	0	19
<i>Aberto Unilateral</i>	0	1	0	5
<i>Bilateral</i>	0	2	0	3
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	11^{a*}	0	27^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	90,2±20,0	0,00±0,00	58,8±35,6
Polo cefálico – Terço inferior				
<i>Orelha Normal</i>	42	6	38	24
<i>BI</i>	0	7 ^{a*}	0	11 ^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	38,7±44,8	0,00±0,00	38,4±40,6

<i>Mandíbula e</i>	<i>Normal</i>	42	4	38	20
<i>Maxila</i>	<i>Retrom</i>	0	9 ^{a*}	0	15 ^b
	%MF	0,00±0,00	72,9±35,6	0,00±0,00	53,1±28,3
<i>Fenda Lábio-</i>	<i>Normal</i>	42	12	38	35
<i>Palatal</i>	<i>Unilateral</i>	0	1	0	2
	<i>Bilateral</i>	0	0	0	2
	Freq. Total de	0	1 ^a	0	4 ^b
	Malformações				
	%MF	0,00±0,00	5,00±10,0	0,00±0,00	9,26±18,8
<i>Língua</i>	<i>Normal</i>	42	4	38	20
	<i>Protusa</i>	0	9 ^{a*}	0	15 ^b
	%MF	0,00±0,00	72,9±35,6	0,00±0,00	53,1±28,3

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; BI – Baixa implantação de orelha; Retrom - Retromicrognatismo. ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

As alterações de membros, anteriores e posteriores, e cauda estão apresentadas na Tabela 05. Nesta, verifica-se que as alterações de cauda ocorreram em frequências semelhantes entre os grupos 02 e 04 (grupo 02 = 24,6%; grupo 04 = 26,6%). No entanto, para as alterações de membros verificou-se uma redução entre estes grupos (membros anteriores: grupo 02 = 100%; grupo 04 = 72,1%; membros posteriores: grupo 02 = 93,7%; grupo 04 = 64,5%). Porém, estas diferenças não são estatisticamente significativas.

Tabela 05 – Anormalidades externas e variações encontradas em membros anteriores, posteriores e cauda na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Membros Anteriores				
<i>Número de Fetos</i>	42	13	38	35
<i>Analizados</i>				
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	0	38	12
<i>Membros Anteriores</i>				
<i>Amelia</i>	0	2	0	9
<i>Focomelia</i>	0	10	0	11
<i>RPA</i>	0	1	0	5
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	13^{a*}	0	23^{b*}
<i>%MF</i>	0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	72,1±29,2
Membros Posteriores				
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	1	38	16
<i>Membros Posteriores</i>				
<i>Amelia</i>	0	0	0	2
<i>Focomelia</i>	0	11	0	14
<i>RPP</i>	0	2	0	5
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	12^{a*}	0	19^{b*}
<i>%MF</i>	0,00±0,00	93,7±12,5	0,00±0,00	64,5±35,3
Cauda				
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	9	38	30
<i>Cauda Enrolada</i>	0	4 ^{a*}	0	5 ^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	24,6±17,5	0,00±0,00	26,6±38,7

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações \pm Desvio padrão; RPA – Retroversão de pata anterior; RPP – Retroversão de pata posterior. ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; $p < 0,05$).

A Tabela 06 apresenta os dados referentes às anormalidades e variações encontradas em número de dedos de patas anteriores e posteriores na prole dos diferentes grupos experimentais. A administração de β -glucana não promoveu alteração nos parâmetros analisados. A associação da β -glucana à ciclofosfamida não provocou alterações entre este grupo e aquele que recebeu somente a ciclofosfamida em relação a patas anteriores. No entanto, para patas posteriores, verificou-se um aumento das alterações no grupo associado (grupo 04) quando este foi comparado àquele que recebeu somente a ciclofosfamida (grupo 02).

Tabela 06 – Anormalidades externas e variações encontradas em número de dedos de patas anteriores e posteriores na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Patatas Anteriores				
Pata Anterior Direita				
<i>Número de Fetos</i>	42	13	38	35
<i>Analisados</i>				
<i>Número de</i> <i>Normais</i>	42	5	38	14
<i>dedos</i> <i>Oligodactilia</i>	0	7	0	21
<i>Polidactilia</i>	0	1	0	0
<i>Sindactilia</i>	0	5	0	8
<i>Freq. Total de</i>	0	8^{a*}	0	21^b
<i>Malformações</i>				
<i>%MF</i>	0,00\pm0,00	80,4\pm14,2	0,00\pm0,00	77,8\pm26,2
Pata Anterior Esquerda				
<i>Número de</i> <i>Normais</i>	42	5	38	15

<i>dedos</i>	<i>Oligodactilia</i>	0	8	0	20
	<i>Polidactilia</i>	0	0	0	0
	<i>Sindactilia</i>	0	5	0	11
Freq. Total de	Malformações	0	8^{a*}	0	20^b
	%MF	0,00±0,00	80,4±14,2	0,00±0,00	76,2±26,1

Patas Posteriores

Pata Posterior Direita

<i>Número de</i>	<i>Normais</i>	42	7	38	17
<i>dedos</i>	<i>Oligodactilia</i>	0	0	0	4
	<i>Polidactilia</i>	0	6	0	14
	<i>Sindactilia</i>	0	6	0	17
Freq. Total de	Malformações	0	6^{a*}	0	18^b
	%MF	0,00±0,00	65,8±29,9	0,00±0,00	72,5±29,7

Pata Posterior Esquerda

<i>Número de</i>	<i>Normais</i>	42	8	38	19
<i>dedos</i>	<i>Oligodactilia</i>	0	0	0	3
	<i>Polidactilia</i>	0	5	0	13
	<i>Sindactilia</i>	0	5	0	18
Freq. Total de	Malformações	0	5^{a*}	0	16^b
	%MF	0,00±0,00	60,8±28,3	0,00±0,00	69,5±30,9

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

Na Tabela 07 estão apresentados os dados referentes às alterações viscerais em polo cefálico no seu terço superior. Quando da análise dos ventrículos cerebrais, pode-se verificar que os laterais apresentaram alterações em todos os grupos experimentais, variando de 43,7% no grupo 03 à 95,0% no grupo 02. Os resultados ainda demonstram que a associação da β -glucana com a ciclosfosfamida não foi eficiente em reduzir os danos causados por este quimioterápico. Os resultados referentes aos terceiro e quarto ventrículos foram idênticos. Verificou-se que as alterações menos importantes aconteceram no grupo 03 e que a associação da β -glucana e a ciclofosfamida não foi eficiente em diminuir os danos causados por este último composto. Quanto às malformações oculares, verifica-se uma redução de cerca de 40% quando se faz a associação da β -glucana com a ciclofosfamida, porém esta redução não foi estatisticamente significativa.

Tabela 07 – Anormalidades viscerais e variações encontradas em polo cefálico, terço superior, na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Cérebro – Hidrocefalia				
<i>Número de Fetos</i>	42	13	38	35
<i>Analisados</i>				
<i>Número de Fetos Normais</i>	19	1	29	8
<i>Ventrículos Leve</i>	10	0	1	0
<i>Laterais Moderado</i>	8	2	8	4
<i>Severo</i>	5	10	0	23
<i>Freq. Total de Malformações</i>	23	12^{a*}	9^{a*}	27^{b*}
<i>%MF</i>	58,4±25,8	95,0±10,0	43,7±37,3	80,2±24,5
<i>Número de Fetos Normais</i>	33	1	37	8
<i>Terceiro Leve</i>	2	0	0	0
<i>Ventrículo Moderado</i>	3	2	1	3
<i>Severo</i>	4	10	0	24

<i>Freq. Total de Malformações</i>	9	12^{a*}	1^{a*}	27^b
<i>%MF</i>	30,0±40,5	95,0±10,0	3,33±10,5	80,2±24,5
<i>Número de Fetos Normais</i>	33	1	35	8
<i>Quarto Leve</i>	2	0	0	0
<i>Ventrículo Moderado</i>	3	2	3	3
<i>Severo</i>	4	10	0	24
<i>Freq. Total de Malformações</i>	9	12^{a*}	3^a	27^b
<i>%MF</i>	30,4±40,5	95,0±10,0	20,0±32,2	80,2±24,5
Olhos				
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	12	38	34
<i>Microftalmia</i>	0	1 ^a	0	1 ^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	6,25±12,5	0,00±0,00	3,70±11,1

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05)

Na Tabela 08 pode-se verificar os dados referentes a alterações torácicas e urogenitais. As alterações cardíacas somente foram verificadas na prole das fêmeas tratadas com β-glucana. No entanto, estas alterações não se apresentaram de forma estatisticamente significativas. Rins em ferradura somente foram observados em um animal do grupo 04. Os megauréteres puderam ser encontrados em todos os grupos, exceto no controle (grupo 01). As maiores ocorrências foram no grupo 02, seguido pelos grupos 04 e 03. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os grupos 01 e 02 e entre 02 e 04. A hidronefrose foi evidenciada em todos os grupos e diferenças estatisticamente significativas foram verificadas entre os grupos 01 e 02 e 02 e 04. Neste último caso, nota-se que a β-

glucana foi eficiente na prevenção das malformações. As agenesias renal e gonadal foram verificadas somente no grupo 04. No entanto, estas ocorrências não foram estatisticamente significativas.

Tabela 08 – Anormalidades viscerais e variações encontradas nas regiões torácica e urogenital na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Região Torácica					
<i>Número de Fetos</i>		42	13	38	35
<i>Analisados</i>					
<i>Coração</i>	<i>Normal</i>	42	13	36	35
	<i>Cardiomeg.</i>	0	0	2 ^a	0
<i>%MF</i>		0,00±0,00	0,00±0,00	3,67±7,78	0,00±0,00
Região Urogenital					
<i>Rins – Anat.</i>	<i>Normal</i>	42	13	38	34
<i>Externa</i>	<i>Rim Ferrad.</i>	0	0 ^a	0	1 ^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,39±4,14
<i>Ureteres</i>	<i>Normal</i>	42	3	36	28
	<i>Megauret.</i>	0	10 ^{a*}	2 ^a	7 ^{b*}
<i>%MF</i>		0,00±0,00	81,7±21,3	3,67±7,78	10,3±20,6
<i>Rins – Anat.</i>	<i>Normal</i>	40	1	32	12
<i>Interna</i>	<i>Hidronefrose</i>	2	12 ^{a*}	6 ^a	23 ^{b*}
<i>%MF</i>		2,86±9,04	91,7±16,6	16,0±27,1	54,6±37,1
<i>Número de Fetos Normais</i>		42	13	38	32
<i>Agenesia Renal</i>		0	0	0	3 ^b

<i>%MF</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	20,4±35,1
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	13	38	34
<i>Agenesia Gonadal</i>	0	0	0	1 ^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,56±16,7

Legenda: %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; Cardiomeg – Cardiomegalia; Anat. – Anatomia; Rim Ferrad. – Rim em ferradura; Megauret. – Megauretères; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

Nas Tabelas 09 e 10 estão apresentados os dados referentes às anormalidades esqueléticas observadas na caixa craniana. A análise estatística demonstrou que a associação da β -glucana à ciclofosfamida não foi eficiente em prevenir os danos causados por esse quimioterápico. Para todos os parâmetros analisados verificou-se um aumento na média da porcentagem de malformações, excetuando-se anormalidades em mandíbula, frontal e interparietal. Nas anormalidades observadas no osso nasal, pôde-se verificar um aumento da média da porcentagem de alterações, já que essa passou de 30,7% no grupo 02 para 83,8% no grupo 04.

Tabela 09 – Anormalidades esqueléticas e variações encontradas em mandíbula, maxila, Pterigóide, Basosfenóide, Hióide, Bulba timpânica e Basoccipital na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos</i>	46	20	42	39
<i>Analisados</i>				
<i>Normal</i>	46	14	42	8
<i>Mandíbula Irregular</i>	0	1	0	31
<i>Oss. Red.</i>	0	5	0	0

<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	6^{a*}	0	31^{b*}
<i>%MF</i>		0,00±0,00	82,5±32,2	0,00±0,00	78,7±28,3
<i>Maxila</i>	<i>Normal</i>	46	11	42	13
	<i>Irregular</i>	0	8	42	26
	<i>Oss. Red.</i>	0	1	0	0
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	9^{a*}	0	26^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	63,6±41,3	0,00±0,00	80,5±30,0
<i>Pterigóide</i>	<i>Normal</i>	46	5	42	5
	<i>Irregular</i>	0	7	0	10
	<i>Ausente</i>	0	8	0	24
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	15^{a*}	0	34^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	88,6±30,2	0,00±0,00	98,2±5,06
<i>Basosfenóide</i>	<i>Normal</i>	46	2	42	5
	<i>Irregular</i>	0	9	0	11
	<i>Ausente</i>	0	9	0	9
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	18^{a*}	0	34^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	95,9±11,7
<i>Hióide</i>	<i>Normal</i>	46	1	42	3
	<i>Reduzido</i>	0	1	0	0
	<i>Ausente</i>	0	18	0	36

<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	19^{a*}	0	36^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	95,3±12,5	0,00±0,00	100±0,00
<i>Bulba</i>	<i>Normal</i>	46	1	42	3
<i>Timpânica</i>	<i>Irregular</i>	0	2	0	0
	<i>Ausente</i>	0	17	0	36
				0	
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	19^{a*}	0	36^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	96,4±9,40	0,00±0,00	98,2±5,06
	<i>Normal</i>	46	2	42	4
<i>Basoccipital</i>	<i>Irregular</i>	0	4	0	9
	<i>Ausente</i>	0	14	0	26
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	18^{a*}	0	35^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	100±0,00

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; Oss. Red. – Ossificação Reduzida; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

Tabela 10 – Anormalidades esqueléticas e variações encontradas em Exoccipital, Nasal, Zigomático, Frontal, Parietal, Interparietal e Supraoccipital na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos</i>	46	20	42	39
<i>Analizados</i>				
<i>Normal</i>	46	2	0	4

<i>Exoccipital</i>	<i>Irregular</i>	0	1	0	2
	<i>Ausente</i>	0	17	0	33
Freq. Total de Malformações		0	18^{a*}	0	35^b
%MF		0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	100±0,00
<i>Nasal</i>	<i>Normal</i>	46	13	42	26
	<i>Irregular</i>	0	4	0	0
	<i>Ausente</i>	0	3	0	13
Freq. Total de Malformações		0	7^{a*}	0	13^b
%MF		0,00±0,00	30,7±36,8	0,00±0,00	83,8±31,1
<i>Zigomático</i>	<i>Normal</i>	46	3	42	7
	<i>Irregular</i>	0	5	0	12
	<i>Ausente</i>	0	12	0	20
Freq. Total de Malformações		0	17^{a*}	0	32^b
%MF		0,00±0,00	88,1±15,0	0,00±0,00	94,6±15,2
<i>Frontal</i>	<i>Normal</i>	46	2	42	4
	<i>Exencefalia</i>	0	5	0	31
	<i>Irregular</i>	0	10	0	4
	<i>Ausente</i>	0	3	0	0
Freq. Total de Malformações		0	18^{a*}	0	35^b
%MF		0,00±0,00	95,3±12,5	0,00±0,00	83,6±30,3
<i>Normal</i>		46	0	42	0

<i>Parietal</i>	<i>Exencefalia</i>	0	5	0	35
	<i>Irregular</i>	0	6	0	6
	<i>Ausente</i>	0	9	0	2
Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	96,4±9,50	0,00±0,00	100±0,00
	<i>Normal</i>	46	1	42	6
<i>Interparietal</i>	<i>Irregular</i>	0	6	0	5
	<i>Ausente</i>	0	13	0	28
Freq. Total de Malformações		0	19^{a*}	0	33^b
%MF		0,00±0,00	96,4±9,45	0,00±0,00	96,4±10,1
	<i>Normal</i>	46	1	42	0
<i>Supraoccipital</i>	<i>Irregular</i>	0	8	0	13
	<i>Ausente</i>	0	11	0	26
Freq. Total de Malformações		0	19^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	96,4±9,45	0,00±0,00	100±0,00

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

Os dados referentes a alterações de ossos da região torácica estão apresentados na Tabela 11. Em todas as análises realizadas o grupo que recebeu a β -glucana isoladamente, grupo 03, não havia apresentado malformações. No entanto, a análise de estéril demonstrou

diferença estatisticamente significativa entre os grupos 01 e 03. A análise também demonstrou que a β -glucana foi capaz de prevenir danos em clavícula, ou seja, encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos 02 e 04. Para os outros parâmetros não houve diferenças estatisticamente significativas. Para alterações de costela e escápula também se verificou uma tendência à redução das malformações.

Tabela 11 – Anormalidades esqueléticas e variações encontradas em Esterno, vértebras, costelas, clavícula e escápulas na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos</i>	46	20	42	39
<i>Analizados</i>				
<i>Normal</i>	46	1	35	0
<i>Nº Est. Anor.</i>	0	3	7	4
<i>Esterno Est. Oss.</i>	0	1	0	5
<i>Red.</i>				
<i>Est. Desal.</i>	0	5	0	1
<i>Est. Fund.</i>	0	10	0	23
<i>Ausentes</i>	0	0	0	6
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	19^{a*}	7^{a*}	39^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	96,4±9,45	17,5±33,4	100±0,00
<i>Normal</i>	46	8	42	9
<i>Nº Vert.</i>	0	2	0	0
<i>Vértebras Anor.</i>				
<i>Vert. Desal.</i>	0	1	0	3
<i>Vert.</i>	0	9	0	13
<i>Irregular</i>				
<i>Vert. Fund</i>	0	0	0	14

Freq. Total de Malformações		0	12^{a*}	0	30^b
%MF		0,00±0,00	85,0±30,1	0,00±0,00	92,5±21,2
Costelas	<i>Normal</i>	46	1	42	6
	<i>Nº Cost.</i>	0	12	0	28
	<i>Anor.</i>				
	<i>Rudimentar</i>	0	3	0	5
	<i>Ausentes</i>	0	4	0	0
Freq. Total de Malformações		0	19^{a*}	0	33^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	98,2±5,06
Clavícula	<i>Normal</i>	46	2	42	17
	<i>Irregular</i>	0	4	0	9
	<i>Ausente</i>	0	13	0	13
Freq. Total de Malformações		0	18^{a*}	0	22^{b*}
%MF		0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	84,1±32,1
Escápula	<i>Normal</i>	46	0	42	8
	<i>Irregular</i>	0	10	0	27
	<i>Ausente</i>	0	10	0	4
Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	31^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	96,9±8,84

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; Nº Est. Anor. – Número de esternebras anormais; Est. Oss. Red. – Esternebras com ossificação reduzida; Est. Desal. – Esternebra desalinhada; Est. Fund. – Esternebras

Fundidas; N° Vert. Anor. – Número de vértebras anormais; Vert. Desal – Vértebras desalinhadas; Vert. Fund. – Vértebras Fundidas; N° Cost. Anor. – Número de costelas anormais; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; $p < 0,05$).

Nas Tabelas 12 e 13 verificou-se que a β -glucana não foi eficiente na prevenção de nenhum tipo de dano em membros, superiores e inferiores. No entanto, observou-se uma importante redução das malformações em pelve, visto que a média da porcentagem de malformações passou de 90,0% no grupo 02 para 52,5% no grupo 04.

Tabela 12 – Anormalidades esqueléticas e variações encontradas em membros superiores na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos</i>	46	20	42	39
<i>Analizados</i>				
<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
<i>Rádio, Úmero e Ulna</i>				
<i>Symmelia</i>	0	13 / 12	0 / 0	30 / 30
<i>Irregular</i>	0	3 / 2	0 / 0	9 / 9
<i>Amelia</i>	0	1 / 2	0 / 0	0 / 0
<i>Ausência</i>	0	2 / 3	0 / 0	0 / 0
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	20^{a*}	0	39^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00
<i>Metacarpos</i>				
<i>Normal (D / E)</i>	46	3 / 3	42 / 42	7 / 7
<i>Anormal</i>	0	9 / 9	0 / 0	17 / 17
<i>Ausência</i>	0	7 / 7	0 / 0	15 / 15

Freq. Total de Malformações		0	17^{a*}	0	32^b
%MF		0,00±0,00	98,2±4,72	0,00±0,00	100±0,00
Falanges Proximais	Normal (D / E)	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	Anormal	0	12 / 12	0 / 0	16 / 16
	Ausência	0	8 / 8	0 / 0	23 / 23
Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00
Falanges Distais	Normal (D / E)	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	Anormal	0	12 / 12	0 / 0	0 / 0
	Irregular	0	1 / 1	0 / 0	0 / 0
	Ausência	0	16 / 16	0 / 0	39 / 39
Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; (D / E) – Direito / Esquerdo; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

Tabela 13 – Anormalidades esqueléticas e variações encontradas em pelve e membros inferiores na prole dos diferentes grupos experimentais:

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos</i>	46	20	42	39
<i>Analizados</i>				
<i>Normal</i>	46	6	0	29
<i>Íleo, Ísquio e Oss. Red.</i>	0	2	0	0
<i>Púbis Irregular</i>	0	0	0	1
<i>Aus. 1 ou +</i>	0	4	0	3
<i>Ausência</i>	0	7	0	6
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	14^{a*}	0	10b*
<i>%MF</i>	0,00±0,00	90,0±19,1	0,00±0,00	52,5±51,2
<i>Tíbia, Fíbula e Fêmur</i>				
<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
<i>Symmelia</i>	0	1 / 1	0 / 0	15 / 15
<i>Fusão</i>	0	8 / 9	0 / 0	3 / 4
<i>Os. Red. 1 ou +</i>	0	1 / 3	0 / 0	0 / 0
<i>Aus. 1 ou +</i>	0	10 / 7	0 / 0	21 / 20
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	20^{a*}	0	39^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00
<i>Metatarsos</i>				
<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
<i>Anormal</i>	0	18 / 18	0 / 0	39 / 39
<i>Ausência</i>	0	2 / 2	0 / 0	0 / 0

Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00
Falanges Proximais	Normal (D / E)	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	Anormal	0	15 / 15	0 / 0	3 / 3
	Ausência	0	5 / 5	0 / 0	36 / 36
Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00
Falanges Distais	Normal (D / E)	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	Anormal	0	5 / 5	0 / 0	3 / 3
	Ausência	0	15 / 15	0 / 0	36 / 36
Freq. Total de Malformações		0	20^{a*}	0	39^b
%MF		0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	100±0,00

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; (D / E) – Direito / Esquerdo; Oss. Red. – Ossificação Reduzida; Aus. 1 ou + - Ausência de 1 ou + ossos; Oss. Red. 1 ou + - Ossificação Reduzida de 1 ou + ossos; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Significa diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

3.2. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

A Tabela 14 apresenta a frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao teste do micronúcleo em sangue periférico. A análise estatística para o primeiro lote (fêmeas prenhes) demonstrou diferença significativa na frequência de

micronúcleos, em T2 e T3, quando comparados os grupos 01 e 02, assim como quando comparados os grupos 02 e 04. Neste último caso verificaram-se porcentagens de redução de danos de 54,2 e 63,4% para os momentos T2 e T3, respectivamente. Estes dados demonstram a eficiência da β -glucana na prevenção de danos clastogênicos. Verificou-se ainda uma redução considerável na frequência de micronúcleos no momento T2 no grupo 03 quando comparado ao grupo 01.

Tabela 14 – Frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao teste de micronúcleos em sangue periférico.

Tratament o	Frequência de Micronúcleo				Média ± Desvio Padrão				%RD	
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T2	T3
Fêmeas prenhes										
<i>Grupo 01</i>	62	78	87	86	6,20±2,30	7,80±2,90	8,70±5,01	8,60±3,44	-	-
<i>Grupo02</i>	61 ^a	71 ^a	362 ^{a*}	414 ^{a*}	6,10±2,60	7,10±2,13	36,20±10,44	41,40±14,54	-	-
<i>Grupo 03</i>	71 ^a	60 ^a	56 ^{a*}	90 ^a	7,10±2,92	6,00±3,77	5,60±3,44	9,00±2,11	-	-
<i>Grupo 04</i>	54 ^b	49 ^b	213 ^{b*}	206 ^{b*}	5,40±3,41	4,90±3,75	21,30±11,67	20,60±6,57	54,2	63,4
Fêmeas não prenhes										
<i>Grupo 01</i>	24	37	31	40	4,80±0,84	7,40±2,41	6,20±4,66	8,00±4,69	-	-
<i>Grupo02</i>	26 ^a	31 ^a	127 ^{a*}	108 ^{a*}	5,20±4,44	6,20±2,86	25,4±16,95	21,6±6,88	-	-
<i>Grupo 03</i>	46 ^{a*}	22 ^a	29 ^a	45 ^a	9,20±2,17	4,40±2,07	5,80±1,64	9,00±5,00	-	-
<i>Grupo 04</i>	29 ^b	33 ^b	69 ^{b*}	79 ^{b*}	5,80±2,59	6,60±2,19	13,8±6,46	15,80±3,70	60,4	42,6

Legenda: ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *diferença estatisticamente significativa. Momentos T0, T1, T2 e T3: coletas de sangue realizadas no 9º, 10º, 11º e 12º dias gestacionais, respectivamente. %RD – porcentagem de redução de danos. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

A análise do segundo lote (fêmeas não prenhes) demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a frequência basal de micronúcleos entre os grupos 01 e 03 no momento T0. Da mesma forma que no lote anteriormente analisado, verificaram-se diferenças significativas entre os grupos 01 e 02, e 02 e 04 nos momentos T2 e T3. Neste caso, as porcentagens de redução de danos para os momentos T2 e T3 foram de 60,4 e 42,6%, respectivamente.

A Figura 01 apresenta o comportamento da frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento no lote de fêmeas prenhes. Nesta análise verificou-se um aumento da frequência de micronúcleos no grupo 02 (tratado com ciclofosfamida) após o T1, e esta frequência continuou aumentando até o final da análise (T3). No grupo 04, verificou-se que a associação da β -glucana à ciclofosfamida foi eficiente na redução da frequência de micronúcleos. No gráfico esta evidência foi verificada pela linha do grupo 04, que se manteve sempre abaixo da do grupo 02. Já quando se fez a análise da β -glucana, isoladamente, pôde-se verificar que a administração das duas doses desta molécula levou a uma redução dos níveis basais de micronúcleos, visto que a linha apresentou-se abaixo da do grupo 01 (controle).

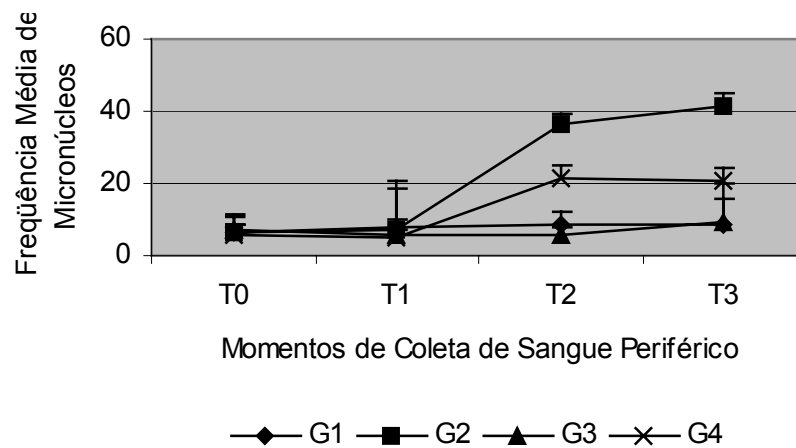


Figura 01 – Comportamento da frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento no lote de fêmeas prenhes. Valores médios \pm Desvio padrão. Momentos T0, T1, T2 e T3 coletas de sangue realizadas no 9º, 10º, 11º e 12º dias gestacionais, respectivamente. G1 – Grupo 01; G2 – Grupo 02; G3 – Grupo 03 e G4 – Grupo 04.

A análise da Figura 02 demonstra o comportamento da frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento no lote de fêmeas não prenhes. Como na análise anterior, verifica-se que a associação da β -glucana à ciclofosfamida promoveu uma redução da

freqüência de micronúcleos. Porém, neste grupo, a administração da β -glucana sozinha não reduziu os níveis basais de danos ao DNA.

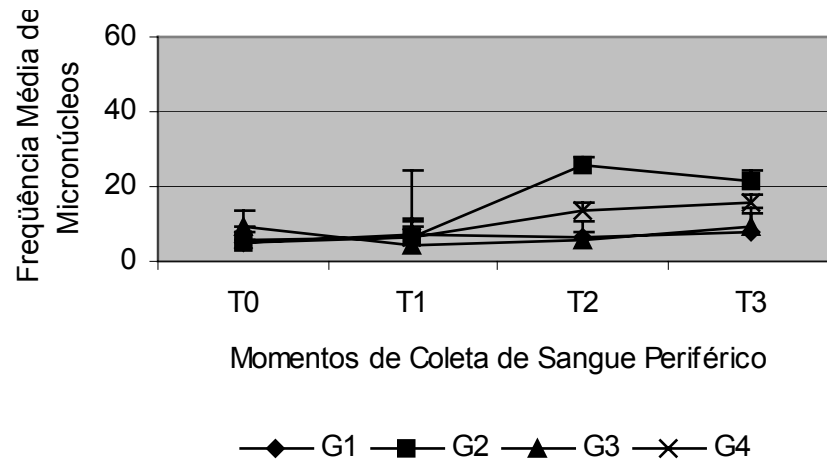


Figura 02 – Comportamento da freqüência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento no lote de fêmeas não prenhes. Valores médios \pm Desvio padrão. Momentos T0, T1, T2 e T3 coletas de sangue realizadas em dias coincidentes com o 9º, 10º, 11º e 12º dias gestacionais das fêmeas do lote anterior, respectivamente. G1 – Grupo 01; G2 – Grupo 02; G3 – Grupo 03 e G4 – Grupo 04.

Na Figura 03 está apresentada a comparação da freqüência de micronúcleos entre os dois diferentes lotes, fêmeas prenhes e não prenhes, durante o período experimental. A análise de T0 demonstra que o nível basal da freqüência de micronúcleos em todos os grupos experimentais, independentemente da gestação, era semelhante. A administração de ciclofosfamida, que pode ser avaliada em T2 e T3, demonstra uma maior susceptibilidade do lote de fêmeas prenhes em comparação com as não prenhes. A maior susceptibilidade a danos no DNA pode novamente ser verificada entre as fêmeas prenhes para o tratamento no qual se faz a associação de ciclofosfamida e β -glucana no momento T2.

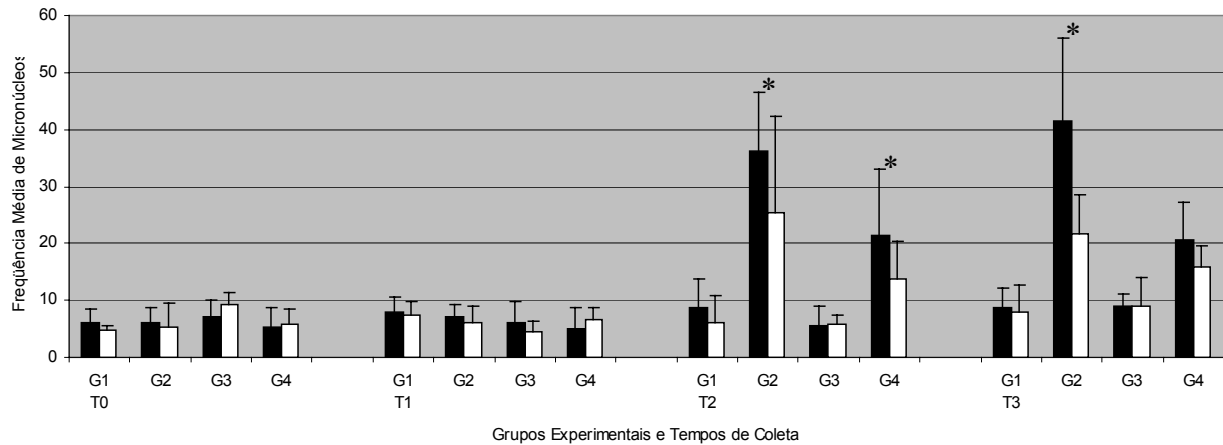


Figura 03 – Comparação da frequência de micronúcleos entre os dois diferentes lotes, fêmeas prenhes e não prenhes, durante o período experimental: Legenda: Barras pretas – fêmeas prenhes; barras brancas – fêmeas não prenhes. Momentos T0, T1, T2 e T3 coletas de sangue realizadas no 9º, 10º, 11º e 12º dias gestacionais das fêmeas do lote 01 e em dias coincidentes no lote de fêmeas não prenhes (lote 02), respectivamente. G1 – Grupo 01; G2 – Grupo 02; G3 – Grupo 03 e G4 – Grupo 04. *Diferenças estatisticamente significativas. (Teste: Qui-quadrado; $p < 0,05$).

4. Discussão

Os resultados obtidos demonstram a eficácia da β -glucana na prevenção de danos clastogênicos, ou seja, um efeito antimutagênico. No entanto, a avaliação na prevenção da teratogenicidade não demonstrou eficiência apesar da melhora do desempenho reprodutivo de fêmeas.

Diferentes protocolos foram desenvolvidos para a prevenção de teratogenicidade induzida por ciclofosfamida e efeitos preventivos foram encontrados em proles que tiveram suas genitoras tratadas com extrato livre de proteínas de sangue bovino, conhecido como Solcoseryl (SHUBERT, 1982)[152]; β -ionona nas doses de 250, 500, 750 e 1000mg/kg (GOMES-CARNEIRO et al., 2003)[51]; e Indole-3-carbinol na dose de 100mg/kg, v.o. (BAILEY et al., 2005)[10].

O presente protocolo utilizou fêmeas expostas ao quimiopreventivo por um período de 3 dias e a exposição ao quimioterápico deu-se somente no segundo dia. Assim pretendeu-se, neste protocolo experimental, conciliar um pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento da β -glucana em relação à ciclofosfamida. Escolheu-se esta forma de

administração devido a estudos *in vitro*, do mesmo grupo de pesquisa, dados não apresentados, indicarem que este polímero de D-glicose possui atividade antimutagênica, sendo o mecanismo de ação caracterizado tanto por desmutagênese quanto por bioantimutagênese. Desta forma, este protocolo permitiria uma melhor efetividade na prevenção da teratogênese e dos efeitos mutagênicos.

A análise de micronúcleos, em T0, demonstrou que não havia diferenças estatisticamente significativas no nível basal de ocorrência destes, exceto para o grupo 03 do lote de fêmeas não prenhes. No entanto, observações clínicas tais como salivação excessiva, diarreia, vômito, hemorragia, pêlos eriçados, mucosas ressecadas, dentre outras; acompanhamento do ganho de peso; consumos de ração e de água; foram avaliados durante todo o período de adaptação dos animais e não demonstraram nenhuma alteração que pudesse justificar esta maior ocorrência de micronúcleos basais no grupo 03 do lote 02. Após a coleta de sangue, os animais receberam as primeiras doses de β -glucana ou veículo. A análise de T1, 24 horas após a primeira administração, permitiu verificar o efeito da β -glucana nos grupos 03 e 04. E neste momento observou-se que não houve nenhuma alteração significativa na frequência de micronúcleos entre os diferentes grupos dos dois lotes que pudesse indicar efeitos tóxicos da β -glucana. Porém, o grupo 03 do lote de fêmeas não prenhes, que no momento T0 possuía uma frequência basal aumentada, igualou-se aos demais no momento T1. Após esta coleta, os animais receberam uma nova dose de β -glucana associada ou não à ciclofosfamida. Assim, no momento T2, pôde-se avaliar a capacidade da β -glucana em prevenir os danos mutagênicos causados pela ciclofosfamida, quando verificou-se uma porcentagem de redução de danos de 54,2% e 60,4% para o lote de fêmeas prenhes e não prenhes, respectivamente. Após esta coleta os animais voltaram a receber a última dose de quimiopreventivo e a análise de T3 demonstrou porcentagem de redução de danos de 63,4% e 42,6%.

As porcentagens de redução de danos não mostraram um comportamento uniforme. Para as fêmeas prenhes houve um aumento de 9,2 na porcentagem de redução de danos. Já para as fêmeas não prenhes houve uma redução de 17,8 na mesma porcentagem.

As figuras apresentadas a respeito do comportamento da frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento demonstram os resultados esperados, ou seja, a redução de danos quando da administração da β -glucana associada à ciclofosfamida. No lote de fêmeas prenhes foi possível verificar uma redução considerável da frequência de micronúcleos basais, apesar desta não ser estatisticamente significativa no grupo que recebeu somente a β -glucana.

Esta condição sugere novos estudos a respeito da possibilidade desta molécula ser utilizada na suplementação de dietas a fim de diminuir riscos, basais e/ou induzidos, do desenvolvimento do câncer. Esta possibilidade pode ser reforçada pela verificação da ausência de danos mutagênicos causados pela dose testada segundo este protocolo. Outro fato interessante a ser mencionado é que β -glucanas, extraídas de fungos, têm sido utilizadas clinicamente no Japão desde a década de 80 na possível prevenção de cânceres (KANENO et al., 1989)[71]. Charvatovicová et al. (1998)[20] ainda indicam a importância de se estudar a administração deste polímero de açúcar concomitantemente aos procedimentos de quimioterapias, devido à possibilidade da redução de efeitos adversos desta prática terapêutica. No entanto, ainda são muito controversos os princípios moleculares e bioquímicos envolvidos na atividade antitumoral, antimutagênica e imunoestimulatória das diferentes β -glucanas (KISHIDA & SONE, 1992; SAITÔ et al., 1991; DEMLEITNER et al., 1992) [77, 145,e 27].

Quando se compara a frequência de micronúcleos entre os dois grupos (fêmeas prenhes e não prenhes) verifica-se que a frequência basal é semelhante. No entanto, as diferenças estatisticamente significativas verificadas nos grupos 02 e 04 em T2 e T3 sugerem uma maior susceptibilidade das fêmeas grávidas frente à indução de micronúcleos. Uma hipótese a ser aventada é que o estado de gravidez leva o organismo materno a uma condição de maior atividade metabólica, e, por conseguinte, a uma maior atividade hepática. Outro fato a ser considerado são as alterações hormonais decorrentes da gravidez. Assim, diante destas duas constatações, faz-se necessário compreender um pouco mais da relação entre aumento de metabolismo, estado de gravidez e enzimas responsáveis pela degradação de xenobióticos.

Frente à todas estas informações e analisando-se a comparação de peso de órgãos, do grupo de fêmeas prenhes, verificou-se que somente houve alteração no peso do fígado dos animais que receberam a ciclofosfamida. O esperado era que houvesse uma relação entre o aumento da massa hepática e um aumento da capacidade metabólica do organismo decorrente do tratamento com o antineoplásico, talvez pelo aumento de retículo endoplasmático. No entanto, o que se verificou, na realidade, foi uma diminuição do peso do órgão. Contudo, podemos sugerir que o tratamento agudo utilizado nesta pesquisa e a avaliação do peso dos órgãos determinado em um tempo relativamente curto, 8 dias após a administração, implique no fato do organismo ainda não ter se recuperado de parte das influências causadas pela administração do quimioterápico. Assim, a inibição da proliferação celular associada a um aumento dos índices de apoptose pode explicar a redução de peso do fígado.

Muitos xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia de doenças podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas (DALY et al., 1993) [25]. Uma

vez que muitos agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos necessitam de ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, ao RNA e às proteínas (ROGERS, 1994) [143], as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham papel crucial na tumorigênese ambiental (BARTSCH & HIETANEN, 1996) [11]. Portanto, a quantidade final efetiva de carcinógenos produzida, depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas (HAYES, 1995) [60]. Além disso, pode-se sugerir que a β -glucana possa ter uma atividade auxiliar ou complementar ao sistema de metabolização de drogas na célula e por isso também facilitariam a excreção dos produtos o que viria a diminuir os danos causados por estes no organismo em estudo.

Na presente pesquisa pôde-se observar ainda que o fato da redução do peso do fígado não se repetiu no grupo que recebeu a associação entre a β -glucana e a ciclofosfamida. Assim a administração desta molécula parece ter interferido em tal efeito biológico reduzindo o número de moléculas tóxicas de ciclofosfamida que atuariam nas células hepáticas. Além disso, a administração desta molécula interferiu no efeito biológico da ciclofosfamida exercendo uma atividade na redução da frequência de micronúcleos verificada para os dois lotes de fêmeas, nos momentos T2 e T3.

Corroborar a hipótese anterior o trabalho de Slameňová et al. (2003) [156] onde investigaram o efeito protetor de três diferentes extratos de β -glucana, em três diferentes concentrações, em danos induzidos por peróxido de hidrogênio e azul de metileno na presença de luz visível demonstrando o efeito antioxidante. O estudo de Patchen et al. (1987) [131] indica efeitos benéficos quando utilizaram β -glucana em animais submetidos à radiação. De acordo com seu estudo, a melhora não se deve somente à regeneração hematopoética, mas também à capacidade desta molécula de inativar radicais livres, que poderiam causar danos ao organismo em teste. Estes resultados também estão em concordância com por Chorvatovicová (1991) [19].

A metabolização da ciclofosfamida pelo sistema enzimático citocromo P-450 tem como produto a 4-hidroxíciclofosfamida, a qual é degradada, espontaneamente, a phosphoramidate mustard and acroleina (MIRKES, 1985) [114]. A phosphoramidate mustard é um conhecido agente alquilante envolvido em processos citotóxicos e com propriedades teratogênicas. A acroleina, por sua vez, está descrita como um potente agente embriotóxico (Mirkes, 1985; Stahlmann et al., 1985) [114 e 163]. Assim, podemos dizer que os metabólitos da ciclofosfamida produzem efeitos adversos no desempenho reprodutivo da fêmea e no

desenvolvimento de sua prole. O presente trabalho permitiu verificar que não houve diferenças significativas para o número de implantes, número de fetos vivos, razão sexual e índice placentário. Como os tratamentos aconteceram somente em uma parte do período de organogênese, não era esperada nenhuma alteração no número de implantes, fato que foi verificado. Nenhuma descrição foi encontrada, na literatura pesquisada, onde fossem relatadas alterações em diferenciação sexual e exposição à ciclofosfamida e/ ou β -glucana.

O peso placentário mostrou-se diminuído no grupo 02 em relação aos demais. No entanto, o índice placentário não demonstrou esta diferença. Estudos indicam aumento do peso placentário em ratas diabéticas (ERIKSSON et al., 1982; URIU-HARE et al., 1985; GIAVINI et al., 1986) [33, 182 e 48] . Os efeitos do diabete materno sobre a arquitetura e o fluxo placentários (ERIKSSON et al),[33] sugerem que o feto desenvolve-se em regime de hipóxia e má nutrição. O aumento da placenta favoreceria o aporte de oxigênio e nutrientes, aumentando a superfície de troca materno-fetal. Contudo, no presente experimento, não foi observado um aumento do índice placentário nos grupos em relação ao controle. Mas observou-se uma drástica redução do peso placentário no grupo que recebeu somente a ciclofosfamida. Durante os procedimentos de onfalectomia verificou-se que o aporte sanguíneo era muito reduzido nos fetos que tiveram suas genitoras tratadas somente com ciclofosfamida ou associada a β -glucana (dados não apresentados). Estes fatos podem sugerir uma má nutrição fetal não relacionada ao aumento do índice placentário, fatos que não são corroborados pela literatura já apresentada. No entanto, corrobora esta inferência de má nutrição a diminuição estatisticamente significativa verificada no peso e comprimento fetal destes dois grupos experimentais. Ainda reforça este achado o estudo da adequação do peso à idade gestacional, que demonstrou que a administração da ciclofosfamida, independentemente da β -glucana, foi a responsável pelos fetos coletados que apresentaram-se com baixo peso para a idade de prenhez. Assim, estes dados sugerem que a β -glucana não teve nenhuma interferência nestes parâmetros

Em uma visão geral, observou-se que a β -glucana não foi eficiente em prevenir as malformações externas, apesar de apresentar uma tendência à redução. Exceções foram verificadas somente em membros anteriores e posteriores.

Os estudos de malformações viscerais indicam que no polo cefálico a associação da β -glucana foi eficiente em prevenir alterações de ventrículos laterais e que a administração desta molécula, isoladamente, foi capaz de prevenir a ocorrência basal de alterações em terceiro e quarto ventrículos cerebrais. Estudos em seres humanos indicam que 7% dos recém-nascidos

apresentam um determinado grau de hidrocefalia que sofre uma redução espontânea, sem comprometer o desenvolvimento da criança. No entanto, uma outra parcela de crianças desenvolvem patologias relacionadas a este acúmulo de líquido nas cavidades cerebrais levando a comprometimentos neuropsicomotores.

A análise de tórax demonstrou que somente o grupo tratado com β -glucana, isolada, apresentou alterações cardíacas. Apesar de uma pequena porcentagem de alterações, talvez resida aqui a necessidade de novas pesquisas nesta área para averiguar se a utilização deste composto está realmente relacionado a uma diminuição das cavidades ventriculares e ao espessamento da parede das câmaras cardíacas, já que estas foram as alterações verificadas.

Por outro lado, a análise da região urogenital demonstra prevenção da ocorrência de megaureteres e hidronefrose. Alterações tais como rim em ferradura, agenesia renal e gonadal só foram encontradas no grupo que recebeu a ciclofosfamida e a β -glucana. A análise esquelética demonstrou prevenção de alterações somente em mandíbula, clavícula e pelve.

Apesar destes resultados, o estudo deste polímero de D-glicose apresentou um dado interessante e de grande valia, ou seja, a administração da β -glucana foi eficiente em aumentar a viabilidade fetal, elevando-a a valores muito similares aos do controle negativo, bem como foi capaz de reduzir as taxas de perda pós-implantacional e de reabsorção. Estes dados demonstram assim que a β -glucana promoveu uma melhora significativa no desempenho reprodutivo destas fêmeas.

Outros estudos relatam que os efeitos teratogênicos causados pela ciclofosfamida podem ser atenuados quando um tratamento com substâncias que inibem as cascatas metabólicas são utilizadas. Algumas dessas substâncias são, por exemplo, a β -ionona e Indole-3-Carbionol (GOMES-CARNEIRO et al., 2003; BAILEY et al., 2005) [51 e 10]. Assim, a presente pesquisa pode sugerir que apesar dos efeitos anticlastogênicos evidenciados, a efetividade da β -glucana em inibir as vias metabólicas que envolvem a CYPs e/ou sua capacidade em se ligar à ciclofosfamida, aos seus metabólitos e/ou de quelar radicais livres ocorreu de forma eficiente no organismo materno, mas não nos embriões. Contudo, ainda não temos dados que indiquem se a β -glucana, metabolizada ou não, foi capaz de atravessar, de forma eficiente e suficiente, a barreira placentária para inativar os processos desencadeados pela ciclofosfamida nos embriões.

Assim, os presentes relatos indicam que a β -glucana possui baixo potencial na prevenção da teratogênese. No entanto, esta parece ser uma efetiva molécula na proteção de danos ao material genético. O fato da administração desta molécula não estar relacionada ao

aparecimento de efeitos adversos e sim à redução basal da frequência de micronúcleos a coloca como um fator na prevenção de carcinogênese, assim como a se tornar um adjuvante nos tratamentos quimioterápicos, visto que a terapia nutricional com antioxidantes concomitante à administração de drogas antineoplásicas apresenta vários benefícios ao tratamento de pacientes oncológicos, resultando em menores efeitos colaterais e permitindo que a continuidade do tratamento empregado não seja prejudicada.

Conclusões:

A aplicação de Beta glucana de *Saccharomyces cerevisiae*:

Não apresenta potencial genotóxico *in vitro*;

Não apresenta potencial mutagênico *in vitro* e *in vivo*;

Quimiopreventivo (agentes de ação direta e indireta);

Mecanismo de ação: desmutagênese e bioantimutagênese;

Independedentemente da origem possui o mesmo potencial quimiopreventivo e mecanismo de ação;

Mecanismo de ação e eficiência de quimioprevenção sofre influência de sistemas metabolizadores;

Células deficientes em reparo auxiliam na confirmação da capacidade de ação por bioantimutagênese;

Melhora a viabilidade celular (previne efeitos apoptóticos);

Não interfere na performance reprodutiva normal de fêmeas e no desenvolvimento de suas proles;

Apresenta boa capacidade antimutagênica em fêmeas prenhes e não prenhes;

Não previne de forma eficiente teratogênese mediada pela exposição aguda por ciclofosfamida;

Eficiente em aumentar a viabilidade fetal;

Redução das taxas de perdas pós-implantação e reabsorção;

Causa melhora no desenvolvimento reprodutivo de fêmeas tratadas com ciclofosfamida.

Comprovação da eficiência em prevenir danos genéticos em humanos;

Melhora da qualidade de vida de pessoas que possuem câncer ou que estão em quimioterapia;

REFERÊNCIAS

- [1] ALVES, I.; OLIVEIRA, N.G.; LAIRES, A.; RODRIGUES, A.S.; RUEFF, J. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. **Mutagenesis**, v. 15, n.3, p. 229-234, 2000.
- [2] AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D. Carcinogens are mutagens. A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.70, p. 2281-2285, 1973.
- [3] AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1983.
- [4] AMES, B.N. Carcinogens and anticarcinogens. In: SHANKEL, D.M. **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms**. New York: Plenum, p. 7-35, 1986.
- [5] ANDRADE, H. H. R.; ANDRADE, H. R.; REGULY, M. L. Prevenção do câncer: o papel da dieta e da quimioprevenção. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 17, p. 369-384.
- [6] ANDERSON, D. & PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 67-73, 1998.
- [7] ANDERSON, D.; YU, T.W.; MC-GREGOR, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, n. 6, p. 539-555, 1998. Bekers, M.; Marauska, M.; Laukevics, J. Oats and fat-free milk based functional food product. *Food-Biotechnology*, Riga, 2001, v.5, n.1, p.1-12.
- [8] AOAC. Official methods of analysis of the association of Official Analytical Chemists, Washington, Dc., 12 ed, 1975.
- [9] ASSIS, E.M. Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtidos por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise, Campinas, 1996, 115p. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas(Unicamp), SP.

- [10] BAILEY, M.M.; SAWYER, R.D.; BEHLING, J.E.; BOOHAKER, J.G.; HICKS, J.G.; O'DONNELL, M.A.; STRINGER, K.R.; RASCO, J.F.; HOOD, R.D.. Incidence of specific cyclophosphamide-induced developmental defects in mice. **Birth Defects Res.**, v. 74, p. 261-267, 2005.
- [11] BARTSCH, H.; HIETEN, E.. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. **Environ. Health Perspect.**, v. 104, p. 569-577, 1996.
BARROW, M.V.; TAYLOR, W.I.. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. **J. Morphol.**, v. 127, p.291-306, 1969.
- [12]BARROW, M.V.; TAYLOR, W.I.. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. **J. Morphol.**, v. 127, p.291-306, 1969.
- [13] BEKERS,M.; MARAUSKA, M.; LAUKEVICS, J. Oats and fat-free milk based functional food product. *Food-Biotechnology, Riga*, 2001, v.5, n.1, p.1-12.
- [14] 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. **Toxicolgy in Vitro**, v. 17, p. 465-469, 2003.
- [15] BORGES, V.C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001, cap. 96, p. 1495-1509.
- [16] BRUSICK, D.J. **Principles of genetic toxicology**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1987, 284 p.CORTÉS, F.; DAZA, P.; PIÑERO, J.; ESCALZA, P. Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. **Mutation Res.**, v. 24, p. 203-207, 1994.
- [17] BURKUS, Z.; TEMELLI, F. Stabilization of emulsions and foams using barley beta-glucan. *Food-Research-International, Canada*, 2000, v. 33, n.1, p. 27- 33.
- [18] CHEM, W.J.L.; ANDERSON, J.W.; GOULD, M.R. Effects of oat bran, oat gum, and pectin on lipid metabolism of cholesterol fed rats. *Nutrition Report International, Los Altos*, v. 24, n. 10, p 1093-1098, 1981.
- [19] CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutation Res.**, v. 371, p. 115-120; 1996.

- [20] CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration. **Mutation Res.**, v. 412, p. 83-89; 1998.
- [21] CHO, K.C.; WHITE, P.J. Enzymatic analysis of B-glucan content in different oat genotypes. *Cereal Chemistry*, 1993, v. 70, n. 5, p. 539-542.
- [22] CISNEROS, R.L.; GIBSON III, F.C.; TZIANABOS, A.O. Passive transfer of poly-(1-6)- β -glucotriosyl-(1-3)- β -glucopyranose glucana protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2201-2205, 1996.
- [23] CONNOR, J.M. & FERGUSON-SMITH, M.A.. eds. **Essential medical genetics**. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987.
- [24] DARROUDI, F. & NATARAJAN, A. T. Cytogenetical characterization of repair-deficient CHO cell line 43-3B. I. Induction of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by UV and its modulation with 3-aminobenzamide. **Mutation Res.**, v. 149, p. 239-247, 1985.
- [25] DALY, A.K.; CHOLERTON, S.; GREGORY, W.; IDLE, J.R.. Metabolic polymorphisms. **Pharmac. Ther.**, v. 57, p. 129-160, 1993.
- [26] DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, v. 402, p. 151-158, 1998.
- [27] DEMLEITNER, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G.. Synthesis and antitumor activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan. **Carbohydr. Res.**, v. 226, p. 247-252, 1992.
- [28] DI LUZIO, N.R.; WILLIAMS, D.L.; MCNAMEE, R.B.; EDWARDS, B.F.; KITAHAMA, A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucana. **Int. J. Cancer.**, v.24, p. 773-779, 1979.
- [29] DI RENZO, L.; YEFENOL, E.; KLEIN, E. The function of human NK cells is enhanced by β -glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p. 1755-1758, 1991.
- [30] DZIEZAK, J. D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. *Food Technology*, Chicago, v. 41, n. 2, p. 103-121, 1987a.

- [31] DZIEZAK, J. D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. *Food Technology*, Chicago, v. 41, n. 2, p. 122-125, 1987b.
- [32] 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**. v.68, p. 1-6, 2003.
- [33] ERIKSSON, R.S.M.; THUNBERG, L.; ERIKSSON, U.J.. Effects of interrupted insulin treatment on fetal outcome of pregnant diabetic rats. **Diabetes**. v. 38, p. 764-772, 1989.
- [34] FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.
- [35] FALCH, B.H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B.T. The cytokine stimulating activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Res.**, v. 329, p. 587-596, 2000.
- [36] FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M.; STINGELE, F.; Producing beta-glucan for improving food structure, texture or stability, involves fermenting a suspension comprising a non-pathogenic saprophytic filamentous fungus and extracting a beta-glucan from the suspension. Patent AU200152219-A (8 Oct, 2001).
- [37] FENECH, M. & MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Res.**, v. 147, p. 29-36, 1985.
- [38] FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Res.**, v. 307, p. 395-410, 1994.
- [39] FERRARI, C.K.B. Oxidative stress pathophysiology searching for an effective antioxidant protection. **Int. Med. J.**, v. 8, p. 175-184, 2001.
- [40] FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Canc.**, v. 48, p. 375-382, 2002.
- [41] FERRARI, I. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: RABELLO-GAY, M.N; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira, 1991, p.107-112.

- [42] FISHER, H.; GRIMINGER, P. Cholesterol-lowering effects of certain grains and of oat fractions in the chick. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967, 126:108.
- [43] FLAGG, E.W.; COATES, R.J.; GREENBERG, R.S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 14, p. 419-427, 1995.
- [44] FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.
- [45] FURCO, A. M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. Anais do “workshop” sobre produção de biomassa levedura utilização em alimentação humana e animal, pp. 52- 58,1996. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.
- [46] GATEHOUSE, D.G. et al. Bacterial mutation assays. In: KIRKLAND, D. J. **Basic Mutagenicity Tests**. New York: Cambridge University Press, 1990, p. 13 - 50.
- [47] GERBHART, E. Antimutagens: data and problems. **Humangenetik**, v. 24, p. 1-32, 1974.
- [48] GIAVINI, E.; BROCCIA, M.L.; PRATI, M.; ROVERSI, G.D.; VISMARA, C.. Effects of streptozotocin-induced diabetes on fetal developmental of the rat. **Teratology**. v. 34, p. 81-88, 1986.
- [49] GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1438-1441, 1999.
- [50] GOMES, E.M.; SOUTOT, P.R.F.; FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. **Mutation Res.**, v. 367, p. 203-208, 1996.
- [51] GOMES-CARNEIRO, M.R.; DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAÚJO, I.B.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, S.N.; PAUMGARTTEN, F.J.R.. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by β -ionone. **Toxicology Letters.**, v. 138, p. 205-13. 2003;
- [52] GRÜTER, A.; FRIEDERICH, U.; WÜRGLER, F.E. Antimutagenic effects of mushrooms. **Mutation Res.**, v. 231, p. 243-249, 1990.

- [53] GRÜTER, A.; FRIEDERICH, U.; WÜRGLER, F.E. The mutagenicity of edible mushrooms in histidine-dependent bacterial test system. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 29, n.3, p. 159-165, 1991.
- [54] GUTERREZ, Z.R.; MANTOVANI, M.S.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; JORDÃO, B.Q. Variation of antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 301-309, 2004.
- [55] HALÁSZ, A.; LÁSZTIT, R. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton, 1991, 312p.
- [56] HA, C.H.; LIM, K.H.; KIM, Y.T.; Lim, S.T. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, 2002, v.58, n.3, p.370-377.
- [57] HANSEMAN, J.K. & HOGAN, M.D.. Selection of the experimental unit in teratology studies. **Teratology**, v. 12, p. 165-72, 1995.
- [58] HARTMAN, P. E. & SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Envir. Molec. Mutagenesis**, v. 15, p. 145-182, 1990.
- [59] HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y., SOFUNI, T.; ISHIDATE Jr., M.. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Res.**, v. 245, p. 245-249, 1990.
- [60] HAYES, R.B.. Genetic susceptibility and occupational cancer. **Med. Lav.**, v. 86, p. 206-13, 1995.
- [61] HEDDLE, J. A. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: EVANS, H. J. AND LLOYD, D. C. **Mutation-Induced Chromosome Damage to Man**, Edinburgh University Press, p. 191-200, 1976.
- [62] HENDENSKOG, G & MOGREN, H> Some methods for processing of single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 15(1): 129-142, 1973
- [63] HOFER, M. & POSPISIL, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 19, p. 607-609, 1997.

- [64] HOLBROOK, T.W.; COOK, J.A.; PARKER, B.W. Immunization against *Leishmania doavani*: glucana as an adjuvant with killed promastigotes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, p. 762-768, 1981.
- [65] HWANG,C.F.; HWANG, C.F. Application of yeasts on food and Bioindustry. *Fungal-Science.Taiwan*, 2001, v.16, n.1-2, p.53-64
- [66] INGLETT, G. Oatrim cuts fat, cholesterol in ice cream. *Science-of-Food-and-Agriculture*. Peoria, IL, USA, 1990, v. 2: n. 2, p. 4-5.
- [67] JAMAS, S., EASSON, D.D., JR., & OSTROFF, G.R (1996). Use of neutral soluble glucan preparations to stimulate platelet production. US Patent 5,488,040.
- [68] JOHNSTON, P. J.; STOPPARD, E.; BRYANT, P. E. Induction and distribution of damage in CHO-K1 and the X-ray-sensitive hamster cell line xrs5, measured by the cytochalasin-B-cytokinesis block micronucleus assay. **Mutation Res.**, v. 1, n. 385, p.1-12, 1997.
- [69] JOHNSTON, P. J.; MACPHAIL, S. H.; STAMATO, T. D.; KIRCHGESSNER, C. U. ; OLIVE, P. L. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. **Radiation Res.**, v. 149, p. 455-462, 1998.
- [70] KADA, T.; KANEKO, K.; MATSUZAKI, S.; MATSUZAKI, T.; HARA, Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. **Mutation Res.**, n. 150, p. 127-132, 1985.
- [71] KANENO, Y.; CHIHARA, G.; TAGUCHI, T.. Activity of lentinan against cancer and AIDS. **Int J. Immunother.**, v. 4, p. 203-213, 1989.
- [72] KAIM, M.S.; LEE, D.C.; LEE, S.G.;PARK,G.M. Composition for external application having anti-inflammatory and skin-irritation reducing effect and containing beta-1,6-branched-beta- 1,3-glucan. Patent, KR2001046743-A (15 Jun 2001).
- [73] KADA, T. & SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. **Bio Essays**, v. 7, n. 3, p. 113-115, 1987.

- [74] KAISER, A.B. & KERNODLE, D. Synergism between poly-(1→6)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranose glucana and cefazolin in prophylaxis of staphylococcal wound infection in a guinea pig model. **Antimicrobiol. Agents Chemoth.**, v. 42; p. 2449-2451, 1998.
- [75] KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; BOONE, C.W.; MALONE, W.A.; HAW, E.T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J.A.; KOPELOVICH, L.; ALI, T.; VINER, J.L.; SIGMAN, C.C. Progress in cancer chemoprevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 889, p. 1-13, 1999.
- [76] KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504 n. 1-2, p. 137-148, 2002.
- [77] KISHIDA, E.; SONE, Y.; MISAKI, A.. Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1,3)-β-D-glucan. **Carbohydr. Polymers.**, v. 17, p. 89-95, 1992.
- [78] KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.
- [79] KLEINER, S.M. **Defense plants: foods that fight disease.** 28 set. 1997. Disponível em: <<http://www.physsportsmed.com>>. Acesso em: 28 set. 1998.
- [80] KIRSCH-VOLDERS, M. & FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokines block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 51-58, 2001.
- [81] KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Res.**, v. 504 n. 1-2, p. 137-148, 2002.
- [82] KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 3, n.2, p. 103-115, 1995.
- [83] KOGAN, G.; SANDULA, J.; KOROLENKO, T.A.; FALAMEEVA, O.V.; POTERYAEVA, O.N.; ZHANAIEVA, S.Y.; LEVINA, O.A. Increased efficiency of lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator – yeast carboxymethyl glucana. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 2, p. 775-781, 2002.

[84] KOLLAR, R.; STURDK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Food Biotechnology*, New York, v. 6, n.3,p.225-237, 1992.

[85] KONG, Q. & LILLEHEI, K.O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med. Hypotheses**, v. 51, p. 405-409, 1998.

[86] KUBALA, L.; RUZICKOVA, J.; NICKOVA, K.; SANDULA, J.; CIZ, M.; LOJEK, A. The effect of (1→3)-β-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Res.**, v. 338, p. 2835-2840, 2003.

[87] KURODA, Y.; JAIN, K. A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Animutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Res.**, v.267, p. 201-209, 1992.

[88] KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Res.**, v. 436, p. 69-97, 1999.

[89] LEE, J.N.; LEE, D.Y.; KIM, G.E. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY*,2001, v .61, n.4, p. 837-841.

[90] LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001, 955p.

[91] LIANG, J.; MELICAN, D.; CAFRO, L.; PALACE, G.; FISETTE, L.; ARMSTRONG, R.; PATCHEN, M.L. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 20, p. 595-614, 1998.

[92] LIN, H.; SHE, SHE, Y.; CASSILETH, B.; SIROTNAK, F.; RUNDLES, S. C. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. **Int. Immunopharmac.**, v. 4, p. 91-99, 2004.

[93] LOWMAN, D.W.; WILLIAMS, D.L. A proton nuclear magnetic resonance method for the quantitative analysis on a dry weight basis of (1 → 3)-beta-D-glucans in a complex, solvent-wet matrix. *JOURNAL of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 2001, v.49, n. 9, p. 4188-4189.

[94] LOHMAN, P.H.M.; GENTILEB, J.M.; FERGUSON, L.R. Antimutagenesis / anticarcinogenesis: screening, methods and biomarkers. **Mutation Res.**, v.496, p. 1-4, 2001.

- [95] LUIZ, R. C. **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro.** 2002. Dissertação [Mestrado] – Instituto Agronômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- [96] 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 Res.**, v. 528, p. 75-79, 2003.
- [97] 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**, v. 68, p. 1-6, 2003.
- [98] MARTINS, A.O.; Determinação das melhores condições de extração de proteínas da *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertação apresentada na Universidade Estadual de Londrina, p-97, Londrina-Pr, 2000.
- [99] MANSON, J.M. & KANG, Y.J.. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYVES, A.W.. ed. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press; 1994, p. 989-1037.
- [100] MCCLEARY, B. V.; AND GLENNIE-HOLMES, M. Enzymic quantification of (1- 3), (1-4) – B-D glucan in barley and malt.1985. J. Inst. Brew. 91:285.
- [101] MACKELVEY-MARTIN, V.M.; HO, E.T.S.; MCKEOWN, S.R.; JOHNSTON, S.R.; MCCARTHY, P.J.; RAJAB, N.F.; DOWNES, C.S. Emerging applications of the single gel electrophoresis (comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. **Mutagenesis**, v.13, n.1, p.1-8, 1998.
- [102] MAEDA, Y.Y.; TAKAHAMA, S.; KOHARA, Y.; YONEKAWA, H. Two genes controlling acute phase responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. **Immunogenetics**, v. 43, p. 215-219, 1996.
- [103] MANNERS, D.J.; MASSON, A.J & PATTERSON, J.C. The structure of Beta-(1-3) – D glucan from yeast cell walls. **Biochemical Journal**, 135(1): 19-30, 1973.
- [104] MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 9, p. 183-203.

- [105] MASIHI, K.N. Immunomodulators in infectious diseases panoply of possibilites. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 22, p. 1083-1091, 2000.
- [106] MATTER, B. & SCHIMID, W. Trenimon-induced chromosome damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 12, p. 217-225, 1971.
- [107] MATSUOKA, A.; OZAKI, M.; TAKESHITA, K.; SAKAMOTO, H.; GLATT, H. R.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. **Mutagenesis**, v. 12, p. 365-372, 1997.
- [108] MAXWELL, S.R.J. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs.**, v. 49, p. 345-61, 1995.
- [109] MEIRA, D.A.; PEREIRA, P.C.M.; MARCONDES-MACHADO, J.; MENDES, R.P.; BARRAVIERA, B.; PELLEGRINO, J.R.J.; REZKALLAH-IWASSO, M.T.; PERAÇOLI, M.T.S.; CASTILHO, L.M.; THOMZAINI, I.; SILVA, C.L.; FOSS, N.T.; CURRI, P.R. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 496-503, 1996.
- [110] MENOLI, R.C.R.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 Res.**, v. 496, p. 5-13, 2001.
- [111] MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cell of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Res.**, v. 371, p. 47-55, 1996.
- [112] MILLER, B.; ALBERTI, S.; LOCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Res.**, v. 192; p. 45-59, 1997.
- [113] MILNER, J.A. Functional foods and health promotion. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1395-1397, 1999.
- [114] MIRKES, P.E.. Cyclophosphamide teratogenesis: a review. **Teratog. Carcinog. Mutag.**, v. 5, p. 75-88, 1985.

[115] MISAKI, A.; JOHNSON, J.; KIRKWOOD, S.; Structure of the cell wall glucan of the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Carbohydrate Research, 6: 150-157, 1968.

[116] Meer, B. U.; ARRIGONI, E. **Effects of oat gum on blood cholesterol levels in healthy young men.** Journal of Swiss Federal Institute of Technology, Department of Food Science, Zurich, n° 38, p 64-68, 2005.

[117] MONTIJN, R.C.; VINK, E.; MULLER, W.H.; VERKLEIJ, A.J. Localization of synthesis of beta 1,6-glucan in *Saccharomyces Cerevisiae*. Journal of Bacteriology, Washington, 1999, v.181, n.24, p. 7414-7421.

[118] MORGAN, K.; PHILLIPS, G.O. Cereal beta-glucans. Handbook- of-hydrocolloids. New Zealand, 2000, p. 287-307.

[119] MORK, A.C.; HELMKE, R.J.; MARTINEZ, J.R. Effects of particulate and soluble (1-3)-beta-glucans on Ca²⁺ influx in NR8383 alveolar macrophages. IMMUNOPHARMACOLOGY, Amsterdam, 1998, v. 40, n.1, p. 77-89.

[119] MOORE, B.A. & PERSUAD, T.V.N. eds. **Embriologia básica.** 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

[120] MUCKSOVA, J.; BABICEK, K.; POSPISIL, M. Particulate 1,3-beta-D-glucan, carboxymethylglucan and sulfoethylglucan - Influence of their oral or intraperitoneal administration on immunological response of mice. FOLIA MICROBIOLOGICA, Praga, 2001, v.46, n.4, p. 559-563.

[121] NISHINA, P. M.;SCHNEEMAN, B. O.; Effects of dietary fibers on nonfasting plasma lipoprotein and apolipoprotein in rats. Journal of Nutrition, Bethesda, v. 121, n.4, p431-437, 1991.

[122] NORTHCOTE, D. H. (1963). The structure and organization of the polysaccharides of yeast Pure and Applied Chemistry, 7, 669-675.

[123] ODIN, A.P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Res.**, v.386, p. 39-67, 1997.

[124] OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Exper. Cell Res.**, v. 198, p. 259-267, 1992.

- [125] OLIVEIRA, R. J.. **Possível efeito do tratamento de ratas prenhes com doses altamente diluídas de arsênio na prevenção da teratogenicidade deste metal.** 2001. 233f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- [126] 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**, v. 40, p. 1775-1780, 2002.
- [127] OTERO, M. A.; VASALLO, M. C.; VERDECIA, O.; FERNÁNDEZ, A process for the complete fractionation of baker's yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Oxford, v. 67, n.1, p.67-71, 1996.
- [128] PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and protein concentrates. *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology*, Tokyo, v.43, n.6, p. 601- 612, 1997.
- [129] PADUA, A. E; OLIVEIRA, C.A.; SGARBIERI, C. V. Importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces sp.*) como fonte de fibra na alimentação. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2000, v.20, n.2, p. 233-239.
- [130] PATCHEN, M.L. & MAC VITTIE, T.J. Dose-dependent responses of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of immunomodulating agent glucana. **Immunopharmac.**, v. 5, p. 303-313, 1983.
- [131] PATCHEN, M.L. & MAC VITTIE, T.J. Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice. **Int. Soc. Immunopharmac.**, v. 7, n.6, p. 923-932, 1987.
- [132] PHELPS, B.J.; GARRIOTT, M.L.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Res.**, v. 521, p. 103-112, 2002.
- [133] PHELPS, B.J.; HOFFMAN, W.P.; GARRIOTT, M.L. Relative percent cell survival and positive response in the in vitro micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 537, p. 115-116, 2003.
- [134] PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; MCFEE, A. F. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Res.**, v. 189, p. 175-183, 1987.

[135] PRESTON, R. J. Short/medium term carcinogenicity tests and genetic and related effects. **IARC Meeting**, France, 1997.

[136] RABELLO-GAY, M.N; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética, p. 107-112, 1991.

[137] RANKIN, A.J.; SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E.J. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B₄ and neutrophil attractant activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1556-1564, 1990.

[138] RAYMUNDO, G.P. **Betaglucana, você conhece?** , 2004. Disponível em: <<http://www.educacional.com.br/>>. Acesso em 25 jul. 2004.

[139] REYNOLDS, J.A.; KASTELLO, M.D.; HARRINGTON, D.G.; CRABS, C.L.; PETERS, C.J.; JEMSKI, J.V.; SCOTT, G.H.; DI LUZIO, N.R. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. **Infect Immun.**, v. 30, p. 51-57, 1980.

[140] REED, G.; NAGODAWITHANA, W. T. *Yeast Technology*, 2nd ed.,1991, 454p.

[141] RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Res.**, v. 344, p. 41-54, 1995.

[142] RODRIGUES, M. A. La R. Teste CHO/HGPRT. In: RABELLO-GAY M. N., RODRIGUES, M. A. La R. & MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Soc. Bras. de Gen./ Rev. Bras. de Gen., 1991, 67p.

[143] ROGERS, A.S.. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. **J. Adolescent Health.**, v. 15, p. 635-640, 1994.

[144] ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOS, P.; COLLINS, A. R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications – Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. **Mutation Res.**, v. 337, p. 57-60. 1995.

- [145] SAITÔ, H.; YOSHIOKA, Y.; USHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y.. Relationship between conformation and biological response for (163)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus ameobocyte ysate and host-mediated antitumor. **Carbohydr. Res.**, v. 217, p. 181-190, 1991.
- [146] SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S. Clastogenic action of ellipticine aver the cell cycle of human lymphocytes and influence of port-treatments with caffeine and ara-C at G2. **Mutation Res.**, v. 248, p. 195-202, 1991.
- [147] SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 8, p. 201-219.
- [148] SANDULA, J.; MACHOVÁ, E.; HRIBALOVÁ, V. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana and its water-solube derivatives. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 323-326, 1995.
- [149] SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Rev. Bras. Canc.**, v. 47, p. 303-308, 2001.
- [150] SASAKI, Y.F.; SAKAGUCHI, M.; YAMAGISHI, T.; YAMADA, H.; SHIRASU, Y. Bio-antclastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil-docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Res.**, v. 320, p. 9-22, 1994.
- [151] SHAHINIAN, S BUSSEY, H. Beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, Oxford, 2000, v. 35, n. 3, p. 477-489.
- [152] SHUBERT, J.. Prevention of experimentally induced cleft palate in mice. **Cleft Palate J.**, v. 19, p.83-88, 1982.
- [153] SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219. SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNECEVIC-VUKCEVIC, J. Detection of natural bio-antimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. **Mutation Res.**, v. 402, p. 52-57, 1998.
- [154] SIDOTI, D. R.; LANDGRAPH, G.M., AND KHALIFA, R.A. Funcional properties of baker's yeast glycan. Presented at the 33rd Annual Meeting of the Institute of Food Technologist, Miami, Florida,1973, Jan. 6-14.

- [155] SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, 184-191, 1988.
- [156] SLAMENOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Let.**, v. 198, p. 153-160, 2003.
- [157] SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 756p.
- [158] SOARES, R.M.D.; DE-SÁ, R.M.; FRANCISCO, A.; OGLIARI, P. **Avaliação do conteúdo de beta-glucanas em novos cultivares brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. Brasília: 52º Reunião Anual da SBPC, 2000. Disponível em: <<http://www.ufsc.br>>. Acesso em: 25 jul. 2004.
- [159] SOLTÝS, J.; BENKOVÁ, M.; BOROSKOVÁ, Z. Immunorestorative effect of glucan immunomodulator on guinea pigs with experimental ascariasis. **Vet. Immunol. Immunop.**, v. 42, p. 379-388, 1994.
- [160] SOLTÝS, J.; BOROSKOVÁ, Z.; DUBINSKY, P.; TOMASOVICOVÁ, O.; AUER, H.; ASPOCK, H. Effect of glucan immunomodulator on the immune response and larval burdens in mice with experimental toxocaris. **Appl. Parasitol.**, v. 37; p. 161-167, 1996.
- [161] SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicol. Let.**, v. 88, p. 91-98, 1996.
- [162] SPEIT, G. & HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203-211, 1999.
- [163] STAHLMANN, R.; BLUTH, U.; NEUBERT, D.. Effects of the cyclophosphamide metabolite acrolein in mammalian limb bud cultures. **Arch. Toxicol.**, v. 57, p. 163-7, 1985.
- [164] STAPLES, R.E. & SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technol.**, v. 39, p. 61-3, 1964.

- [165] STOPPER, H.; FULL, M.; HELBIG, R.; SPEIT, G. Micronucleous induction by neocarzinostati and methylmethanesulfonate in ionizing radiation-sensitive chinese hamster V79 cell mutants. **Mutation Res.**, v. 383, p.107-112, 1997.
- [166] SURH, Y.J.; SHLYANKEVICH, M; LEE, J.W.; YOO, J.K. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo[a] pyrene y isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. **Mutation Res.**, v. 367, p. 219-224, 1996.
- [167] SURRALLÉS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; CATALÁN, J.; NORPA, H.; MARCOS, R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. **Mutation Res.**, v. 341, p. 169-184, 1995.
- [168] TAKAHASHI, H.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Association of immunological disorders in tethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. **Immun. Med. Microb.**, v. 31, p. 1-14, 2001.
- [169] TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidias. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, cap. 6, p. 151-168.
- [170] TAYLOR, P.. ed. **Practical teratology**. New York: Academic Press; 1986.
- [171] THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F.. eds. **Thompson & Thompson genetics in medicine**. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
- [172] TICE, R. R. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D.H. E VENITT, S. **Environmental Mutagenesis**, Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995, p. 315-339.
- [173] TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. **Mutation Res.**, v. 35, p. 206-221, 2000.
- [174] TOHAMY, A.A.; EL-GHOR, A.A.; EL-NAHAS, S.M.; NOSHY, M.M. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. **Mutation Res.**, v. 541, p. 45-53, 2003.

[175] TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, I.W.; WILLIAMS, L.D. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30; p. 393-402, 2001.

[176] TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; TANAKA, S.; TAMURA, H.; YADOMAE, T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1→3)- β -D-glucan, CSBG from *Candida*. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 22, p. 384-394, 2000.

[177] TURNBULL, J.L.; PATCHEN, M.L.; SCADDEN, D.T. The polysaccharide, PGG-glucan, enhances human myelopoiesis by direct action independent of and additive to early-acting cytokines. **Acta Haematol.**, v. 102, p. 66-71, 1999.

[180] TZIANABOS, A.O. & CISNEROS, R.L. prophylaxis with the immunomodulator PGG glucana enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 797, p. 285-287, 1996.

[181] UTSUGI, T.; MINEMURA, M.; HIRATA, A.; ABE, M. Movement of yeast 1,3- beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. **OXFORD, Journal GENES CELLS**, 2002, V.7, p 518-525.

[182] URIU-HARE, J.; STERN, J.S.; REAVEN, G.M.; KEEN, C.L.. The effect of maternal diabetes on trace element status and fetal developmental in the rat. **Diabetes**. v.35, p.1031-1040, 1985.

[183] VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Res.**, v.392, p. 31-43, 1997.

[184] VOGEL, E.W. **Assessment of chemically-induced genotoxic events**: Prospectives and limitations. Leiden: Universitaire Pers, 1982.

[185] YUN, C.H.; ESTRADA, A.; KESSEL, A.V.; GAJADHAR, A.; REDMOND, M.; LAEARVELD, B. Immunomodulatory effects of oat β -glucan administered intragastrically or parenterally on mice infected with *Eimeria vermiciformis*. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, p. 457-465, 1998.

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

[187] WATTERS, K.; BLASIDELL, P. Reduction of glycaemic and lipid levels in diabetic mice by plant fibre. *Diabetes*, New York, v.38, n.12, p. 1528, 1989.

[188] WEISBURGER, J.H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 943-948, 1999.

[189] WEISBURGER, J.H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v. 16, p. 767-773, 2000.

[190] WAHLSTROM, V. L.; FUGELSANG, K. C. Utilization of yeast hulls in Wine making observed. Research bulletin. California State University, Fresno, 1987, pp.1-5.

[191] WILLIAMS, D. L.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; PRETUS, H. E.E.; A method for the solubilization of a (1-3) Beta – D –glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research*, n. 219, p.203-213, 1991.

[192] WILSON, J.G.. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J. eds. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: The University of Chicago Press; 1965.

[193] YOUNG, TACK-LEE.; JI, YOUNG-JUNG. Quality characteristics of barley beta-glucan enriched grains fabricated by extrusion forming. *Food-Science-and-Biotechnology*, Korea, v. 9, n.6, p.335-340.

[194] ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996, 336p.

[195] 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. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 547-556, 1999.

[196] ZIMMERMAN, J.W.; LINDERMUTH, J.; FISH, P.A.; PALACE, G.P.; STEVENSON, T.T.; DeMONG, D.E. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β -(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 22014-22020, 1998.