



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLISIA MARA CARREIRA

**EFEITOS DA β -GLUCANA SOBRE ATIVIDADE
ANTITUMORAL IN VITRO E SOBRE O ESTADO
NUTRICIONAL, PARÂMETROS LABORATORIAIS E
INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES
COM CÂNCER DE MAMA**

CLISIA MARA CARREIRA

**EFEITOS DA β -GLUCANA SOBRE ATIVIDADE
ANTITUMORAL *IN VITRO* E SOBRE O ESTADO
NUTRICIONAL, PARÂMETROS LABORATORIAIS E
INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES
COM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2012

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C314e Carreira, Clisia Mara.

Efeitos da β -glucana sobre atividade antitumoral *in vitro* e sobre o estado nutricional, parâmetros laboratoriais e indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama / Clisia Mara Carreira. – Londrina, 2012.
128 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Polissacarídeos – Teses. 2. *Saccharomyces cerevisiae* – Teses. 3. Mamas – Câncer – Teses. 4. Suplementos dietéticos – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio Roberto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

CLISIA MARA CARREIRA

EFEITOS DA β -GLUCANA SOBRE ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL, PARÂMETROS LABORATORIAIS E INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
UEL – Londrina - PR

Prof^a Dra. Verônica Elisa Pimenta Vicentini
UEM – Maringá - PR

Prof^a Dra. Lúcia Regina Ribeiro
UNESP – São Paulo - SP

Prof^a Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Isaías Dichi
UEL – Londrina – PR

Londrina, 13 de abril de 2012.

A Minha Mãe Deise

Mãe: uma palavra pequena de significado infinito,
Pois quer dizer amor, dedicação,
Renúncia a si própria, força e sabedoria.
Você me deu a luz, me trouxe a paz, me deu o mundo
Eu te adoro desde o primeiro segundo, É pai e mãe,
És o meu chão, melhor amiga, És o meu anjo,
Vou te amar por toda a vida.
Tu és a razão da minha vida,
Minha força minha inspiração
Luz do meu caminho que me guia e me da direção
Abraço que ampara e acalma o meu coração.
Queria lhe dizer o que eu sinto aqui dentro de mim
Sentimento puro e verdadeiro de um amor sem fim.
Mãe quero lhe falar neste dia de todo coração
Como é bom lhe chamar de mãe,
Com carinho, num ato de amor e
por vontade do senhor ganhei de presente a vida.

Ao Meu Esposo: Luiz Antonio Alves

O que dizer meu grande Amor!
Faltam-me palavras para expressar os sentimentos mais profundos:
Gratidão, amor, compreensão, sabedoria e admiração.
Você sempre foi e será meu Anjo Guardião... TE AMO!
Deus confiou a mim tuas lágrimas.
Me deu a missão de estar contigo aonde for
Te socorrer quando andares mal.
Ser teu conforto quando sentires dor
Sou mais que um amigo, sou teu anjo guardião.
Aquele que te leva ao céu, te carrego pela mão
E sempre serei os teus olhos quando a dor te cegar.
Te levo em meu colo se o teu passo falhar
Serei um elo entre o céu e você
Pra sempre serei tua luz se a escuridão te assustar
O abraço e o ombro pro teu pranto rolar
Serei um elo entre o céu e você
Sou teu anjo guardião, Deus confiou a mim teus segredos
Tudo do teu coração pra que eu possa te ajudar
Ser teu abrigo quando a chuva vir,
Ser teu apoio pra não te deixar cair
Sou mais que um amigo, é teu anjo guardião
Aquele que te leva ao céu, te carrego pela mão
Vou te abraçar com minhas asas,
Levarei teu coração ao coração de Deus (Canal da Graça)

AGRADECIMENTOS

A *Deus* sempre, acima de tudo e em primeiro lugar;

A todos da *Família Canônico e Carreira*, obrigada pelo apoio, torcida e pelas orações;

A minha irmã *Lessimara*. Querida irmã quero lhe dizer uma coisa, você sabia que: irmãs vieram do mesmo lugar? Que conhecem bem o caminho que trilharam juntas. Sabem das dores, das cores, das certezas e incertezas! São as melhores amigas. Vivem as mesmas cenas, mas as percebem diferentes. Brigam, se amam, mas se respeitam! Choram juntas, brincam juntas, reclamam juntas, sonham, falam baixo, falam alto, falam muito, muito mesmo! Também resmungam, lamentam, mas celebram e festejam, mas a vida nos leva a tomar rumos diferentes, nos afastando temporariamente, mesmo assim nos telefonamos, nos vemos, nos consolamos e quando nos perdemos, nos reencontramos, pois entendemos a importância que uma tem pra outra. E assim vivemos com intensidade uma pela outra, e não mais nos separamos! Obrigada por ser minha irmã;

A irmã do coração, *Monica Labrunie*. Você minha amiga de fé, minha irmã camarada, amiga de tantos caminhos e tantas jornadas... Parece que nossos destinos estavam traçados, quando nos encontramos pela primeira vez, agora somos como almas gêmeas, como o céu e o mar... Amigas para sempre é o que nós iremos ser, na primavera ou em qualquer das estações, nas horas tristes nos momentos de prazer, amigas para sempre... Te adoro! “Quem me dará um ombro amigo quando eu precisar? E se eu cair, se eu vacilar, quem vai me levantar? Sou eu, quem vai ouvir você quando o mundo não puder te entender. Foi Deus, quem te escolheu pra ser o melhor amigo que eu pudesse ter. Amigos, pra sempre bons Amigos que nasceram pela fé. Para sempre amigos sim, se Deus quiser quem é que vai me acolher, na minha indecisão se eu me perder pelo caminho quem me dará a mão. Foi Deus, quem consagrou você e eu para sermos bons amigos, num só coração. Por isso eu estarei aqui quando tudo parecer sem solução. Peço a Deus que te guarde” (Anjos de Resgate);

Ao mestre Prof. Dr. *Mário Sérgio Mantovani*, pela oportunidade, por acreditar nos meus objetivos e auxiliar-me a encontrar o caminho correto. Obrigada pelos conselhos, pela amizade e por ter me recebido em seu laboratório para que pudesse concretizar parte de meu sonho. Assim, agradeço pelos ensinamentos até o momento e espero que nossa parceria continue por muito tempo;

Ao *Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental* da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade oferecida;

Ao *CNPQ, Fundação Araucária e CAPES*, pelo suporte financeiro para a realização dos experimentos, aquisição de equipamentos e pela bolsa;

Ao *Instituto de Câncer de Londrina (ICL)*, pela permissão concedida para a realização do ensaio clínico com as pacientes com câncer de mama, além do livre acesso as suas dependências, funcionários e arquivos médicos;

Ao Dr. *José Oliveira Couto Filho* pelo apoio e incentivo para a realização da pesquisa no ICL;

As *pacientes do ICL*, - a participação de vocês foi essencial para a realização desse trabalho, obrigada pela confiança, parceria e dedicação. Com vocês aprendi a lição mais importante de todas, solidariedade e o amor fraterno. Deus abençoe vocês;

Ao *Laboratório de Análises Clínica Cetel* pela realização das coletas de sangue e exames;

À amiga *Daniele Sartori* pela colaboração em todas as fases deste trabalho, pelo incentivo e empurrão e pela amizade presente nos momentos mais difíceis;

A amiga *Sandra Lepri*, querida amiga adquirida, você compartilhou comigo momentos importantes, sempre demonstrando carinho e dedicação, chamou-me atenção na hora certa, socorreu-me em momentos de dificuldade e desânimo, além, claro, de partilhar momentos especiais. Obrigada pela dedicação e paciência comigo;

As amigas: *Alessandra, Carol, Monique, Valéria e Monica*. Meninas é tão difícil dizer o quê cada uma de vocês representa para mim, mas vou tentar... Vocês me ajudaram a chegar até aqui. Empurraram-me para dar os últimos passos. Obrigada por toda ajuda e auxílio, obrigada pela presença constante, por todos os momentos, aflições e felicidades compartilhadas. Pelas orações e pelas quartas-feiras das mulheres, a noite mais esperada dos últimos anos, obrigada pelo filme *Mama Mia*, pela *Jurupinga*, pelo vinho *Chalise*, pela gastronomia, pelas músicas e risadas, mesmo nos momentos mais difíceis, e vocês sabem que não foram poucos. O mais importante é que sabia que podia contar com a amizade de vocês. Saibam que possuem raízes em meu coração e que daqui jamais sairão. Amo vocês!

Aos amigos *Isaías Dichi e Jane Bandeira Dichi*: "O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis" (Fernando Pessoa);

Ao amigo e irmão **Rodrigo Juliano Oliveira**, meu muito obrigado! Você foi minha fonte de inspiração para a realização desse doutorado, você me ajudou a caminhar, me ajudou a levantar e me ajudou a vencer todos os obstáculos que a vida me ofereceu, você meu herói, mesmo longe, está muito, mas muito presente, em minha vida, pois você está gravado no meu coração. Pode ter certeza que onde estivermos nossas almas e nossos corações, estarão juntos, prontos para mais uma vitória;

A **todos os colegas de trabalho** que torceram por mim, desde o início dessa jornada: Dora, Audrey, Joice, Marlene, Mirela, Raphaela, Arcélio, Anselmo, Alissana, Lúcia;

A **todos os docentes e discentes** do programa, que muito contribuíram para meu crescimento profissional. Agradeço pela atenção, pelos ensinamentos e apoio durante o processo de doutoramento: meus sinceros agradecimentos!

CARREIRA, Clisia Mara. **Efeitos da β -glucana sobre atividade antitumoral *in vitro* e sobre o estado nutricional, parâmetros laboratoriais e indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.** 2012. 128f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

β -glucana (β G) são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação presente entre as unidades de glicose. A β -glucana é considerada um modificador da resposta biológica em razão de suas propriedades imunomoduladora, anticarcinogênica e antimutagênica capaz de prevenir danos ao DNA. Outros estudos mostram os efeitos benéficos da β G na hipercolesterolemia, hiperglicemia e na hipertensão arterial, ressaltando que não houve efeitos adversos relatados após o consumo de uma dieta rica em β G. No entanto o papel das β -glucanas no câncer de mama ainda não é bem compreendido. Nesse sentido o objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos da β G sobre a expressão dos genes CCNA1, CASP9 e SOD1 em células MCF-7, por meio do ensaio da RT-PCR em tempo real e também investigar os efeitos da suplementação da β G de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o perfil nutricional e dietético, parâmetros hematológicos, bioquímicos e os indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama em tratamento quimioterápico. A β G utilizada na pesquisa não apresentou citotoxicidade. Para os testes *in vitro* foram utilizadas as concentrações de 50 μ g/mL de β G e 0,1 μ g/mL para doxorrubicina (DOX). Os resultados demonstraram que células MCF-7 expostas a β G extraída de *S.cerevisiae* aumentou a expressão do gene CASP9, induzindo apoptose e a exposição simultânea destas células a β G e a DOX aumentou a expressão de ciclina A1 e de SOD1, indicando que essa associação pode ser responsável pelo aumento das defesas intracelulares antioxidantes e assim contribuir com a inibição da proliferação das células MCF-7 bem como contribuir para o reparo na lesão do DNA provocado pelo quimioterápico. Para a investigação do efeito da β G sobre os parâmetros nutricionais, laboratoriais e sobre o estresse oxidativo, foram acompanhadas 52 pacientes com câncer de mama, antes e após a suplementação de um grama de β G ou gelatina, durante 84 dias de tratamento antineoplásico. A média de idade foi de 52,04 \pm 8,97 anos, a maioria não ingeriam álcool, não eram tabagistas e não praticavam atividade física regular. A avaliação nutricional realizada identificou prevalência de sobrepeso e obesidade, com risco elevado de complicações metabólicas e doença cardiovascular, entretanto não houve diferença significativa antes e após a suplementação e entre os grupos. Houve aumento significativo nos níveis hematológicos após a suplementação com β G: hemoglobina (p=0,031), hematócrito (p=0,021), basófilos (p<0,001) e eosinófilos (p=0,005) e redução significativa nos níveis plasmáticos de LDL - colesterol (p=0,021) e dos triacilgliceróis (p=0,005), entretanto, no grupo controle (gelatina) houve redução significativa nos níveis de hemoglobina (p=0,013), leucócitos (p=0,001), linfócitos (p<0,001) e eosinófilos (p=0,046). A análise dos marcadores de estresse oxidativo indicou redução significativa nas concentrações plasmáticas de NO (p<0,001) após a suplementação com β G. Em relação ao consumo alimentar, observou-se redução significativa na ingestão de gordura saturada e um aumento significativo na ingestão de gordura monoinsaturada, nos dois grupos. Os demais nutrientes avaliados não tiveram alterações com nível de significância estatística. Entretanto na avaliação da prevalência de inadequação do consumo de vitaminas e minerais, chama atenção o fato de que todas as vitaminas antioxidantes e o cálcio apresentaram alta prevalência de inadequação. Foi possível observar que a ingestão alimentar das pacientes não estava de acordo com as recomendações

dietéticas internacionais para a maioria dos nutrientes, indicando alta prevalência de inadequações, e a suplementação com β -glucana não alterou o estado nutricional das pacientes, mas melhorou significativamente os níveis hematológicos, reduziu LDL-col, triacilgliceróis e concentrações plasmáticas de NO. Diante do exposto, sugere-se que a β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* possa ser um importante nutriente adjuvante para pacientes com câncer em terapia antineoplásica e também se faz necessário maior atenção ao estado de saúde e a ingestão alimentar desta população.

Palavras-chave: β -glucana. Câncer de mama. Perfil nutricional. Ingestão dietética. Estresse oxidativo.

CARREIRA, Clisia Mara. **Effects of β -glucan on antitumor activity in vitro and on nutritional status, laboratory parameters and indicators of oxidative stress in women with breast cancer.** 2012. 128p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

β -glucan (β G) are structural polysaccharides of the cell wall of yeast, fungi and some grains, which differ by this type of connection between the glucose units. The β -glucan is considered a biological response modifier because of its biological response modifier because of its immunomodulatory, anticarcinogenic and antimutagenic properties, able to prevent DNA damage. Other studies have shown the beneficial effects of β G in hypercholesterolemia, hyperglycemia and hypertension, emphasizing that no adverse effects reported after consumption of a diet rich in β G. However the role of β -glucans in breast cancer is not well understood. So, the purpose of this study was to evaluate the effects of β G on the expression of genes CCNA1, CASP9 and SOD1 in MCF-7 cells by means of RT-PCR assay in real time and also to investigate the effect of supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* β G on the dietary and nutritional status, hematological, and biochemical indicators of oxidative stress in women with breast cancer undergoing chemotherapy. The β G used in the study did not show cytotoxicity. In this in vitro tests were used the concentration of 50 μ g/mL of β G and 0.1 μ g/mL to doxorubicin (DOX). Results demonstrated that the MCF-7 cells exposed to β G extracted from *S.cerevisiae* increased gene expression CASP9, inducing apoptosis, but was not able to stop cell cycle. The simultaneous exposure of these cells the β G and DOX increased the expression of cyclin A1 and SOD1, indicating that this association may be responsible for the increase of the intracellular antioxidant defenses and thus contribute to the inhibition of proliferation of MCF-7 cells and contribute to repair the DNA damage caused by chemotherapy. To investigate the effect of β G on nutritional, laboratory and on oxidative stress, were followed 52 patients with breast cancer before and after supplementation of one gram of β -glucan or gelatin during 84 days of antineoplastic treatment. The mean age was 52.04 \pm 8.97 years old, the majority did not ingestion of alcohol, were not smokers and did not make exercise regularly. The nutritional assessment carried out identified the prevalence of overweight and obesity with increased risk of metabolic complications and cardiovascular disease, however no significant difference was found before and after supplementation and between groups. A significant increase in blood levels after supplementation with β G: hemoglobin (p=0.031), hematocrit (p = 0.021), basophils (p<0.001) and eosinophils (p=0.005) and significant reduction in plasma levels of LDL - cholesterol (p=0.021) and triglycerides (p=0.005), however, in the control group (gelatin), significant decreases in hemoglobin (p=0.013), leukocytes (p=0.001), lymphocytes (p<0.001) and eosinophils (p=0.046). The analysis of oxidative stress markers showed a significant reduction in plasma concentrations of NO (p<0.001) after supplementation with β -glucan. In relation to food intake, we observed a significant reduction in saturated fat intake and a significant increase in monounsaturated fat intake in both groups. The other nutrients did not change with the level of statistical significance. However in assessing the prevalence of inadequate intake of vitamins and minerals, it is noteworthy that all the antioxidant vitamins and calcium showed a high prevalence of inadequacy. It was observed that food intake of patients was not in accordance with international dietary recommendations for most nutrients, indicating a high prevalence of inadequacies, and supplementation with β -glucan did not alter the nutritional status of patients, but significantly improved blood levels reduced LDL-chol, triglycerides

and plasma concentrations of NO. Therefore, it is suggested that the β -glucan of *Saccharomyces cerevisiae* may be an important nutrient adjunct for patients with cancer and cancer therapy is also needed greater attention to health status and food intake in this population.

Keywords: β -glucans. Breast cancer. Expression genica. Oxidative stress. Nutritional profile. Dietary intake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da β -glucana.....	21
Figura 2 - Ativação imune induzida pela β -glucana.....	29
Figura 3 - Captação e ações subsequentes de β -glucanas em células do sistema imunológico.....	31
Figura 4 - Esquema simplificado da regulação do ciclo celular.....	33
Figura 5 - Visualização simplificada do mecanismo de morte celular por apoptose mediado pelas vias das caspases.....	35
Figura 6 - Fontes geradoras de Eros causadoras de danos no DNA.....	36

ARTIGO 1

Figura 1 - Valores médios \pm desvio padrão da viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT após 24h de tratamento das células MCF-7 com DOX.....	57
Figura 2 - Valores médios \pm desvio padrão da viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT após 24h de tratamento das células MCF-7 com β G.....	58
Figura 3 - Expressão relativa do gene CCNA1, em relação ao gene normalizador GAPDH, na linhagem celular MCF-7 em diferentes tratamentos.....	59
Figura 4 - Expressão relativa do gene CASP9, em relação ao gene normalizador GAPDH, na linhagem celular MCF-7 em diferentes tratamentos.....	59
Figura 5 - Expressão relativa do gene <i>SOD1</i> , em relação ao gene normalizador <i>GAPDH</i> , na linhagem celular MCF-7 em diferentes tratamentos.....	60

ARTIGO 2

Figura 1 - Esquema de acompanhamentos das pacientes durante o ensaio clínico.....	78
--	----

ARTIGO 3

Figura 1 - Esquema de acompanhamentos das pacientes durante o ensaio clínico.....	100
Figura 2 - Frequência dos sintomas relatados pelas pacientes, dos dois grupos de estudos, Londrina, 2008-2010.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura, origem e atividade biológica da β -glucana	22
ARTIGO 1	
Tabela 1 - Primers usados para Amplificação por PCR-RT	56
ARTIGO2	
Tabela 1 - Distribuição percentual das variáveis demográficas e estadiamento clínico, antes da suplementação, Londrina, 2008-2010.....	80
Tabela 2 - Distribuição percentual do IMC, circunferência da cintura e % gordura corporal das mulheres com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010	81
Tabela 3 - Valores da mediana e quartis do hemograma, perfil lipídico e PCR das pacientes com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010	82
Tabela 4 - Valores da mediana e quartis dos marcadores do estresse oxidativo das pacientes com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010	82
ARTIGO 3	
Tabela 1 - Distribuição percentual das características sócio-demográficas, estadiamento clínico e hábitos de vida das mulheres com câncer de mama, de acordo com o grupo de estudo, Londrina, 2008-2010	103
Tabela 2 - Distribuição percentual do IMC, circunferência da cintura e % gordura corporal das mulheres com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010	104
Tabela 3 - Valores da mediana e quartis da ingestão energética e dos nutrientes das pacientes com câncer de mama antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010	105
Tabela 4 - Valores da mediana e quartis da ingestão de retinol, ácido ascórbico, cianocobalamina, tocoferol, cálcio, ferro, zinco e cobre das pacientes com câncer de mama antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010	106

Tabela 5 - Prevalência de inadequação da ingestão de retinol, ácido ascórbico, cianocobalamina, tocoferol, cálcio, ferro, zinco e cobre das pacientes com câncer de mama antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOPP	PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTÉICA
Ba	BASÓFILOS
CASP9	APOPTOSIS-RELATED CYSTEINE PEPTIDASE
CAT	CATALASE
CCNA1	HOMO SAPIENS CYCLIN A1
CDKs	QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS
CR3	RECEPTOR DO SISTEMA COMPLEMENTO 3
CT	COLESTEROL TOTAL
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DOX	DOXORRUBICINA
EROs	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
Es	EOSINÓFILOS
GAPDH	HOMO SAPIENS GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
Glico	GLICOSE
GPx	GLUTATIONA PEROXIDASE
HB	HEMOGLOBINA
HDL	COLESTEROL-HDL
HT	HEMATÓCRITO
ICL	INSTITUTO DE CÂNCER DE LONDRINA
IGF-I	FATOR DE CRESCIMENTO INSULINA SÍMILE
IMC	ÍNDICE DE MASSA CORPORAL
INCA	INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER
LDL	COLESTEROL-LDL
Li	LINFÓCITOS
Lt	LEUCÓCITOS
MCF-7	CÉLULAS DE CARCINOMA DE MAMA HUMANO
Mn	MONÓCITOS

MTT	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE
ON	ÓXIDO NÍTRICO
ODC	ORNITINA-DESCARBOXILASE
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
PAMPs	ORGANISMOS PATOGÊNICOS ASSOCIADOS A PADRÕES MOLECULARES
PCR	PROTEÍNA C REATIVA
Plaq	PLAQUETAS
PRRs	RECEPTOR PADRÃO DE RECONHECIMENTO
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
RT-PCR	TESTE DE REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA, SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL
SOD	ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE
SOD1	GENE (CU, ZN-SOD CITOPLAMÁTICA)
TBARS	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO
TG	TRIACILGLICERÓIS
TGF-β	FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE- β
TLR	RECEPTOR TOLL-LIKE
βG	BETA-GLUCANA
BGR	DECTIN-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	17
1.2	CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DA B-GLUCANA.....	19
1.2.1	Propriedades Biológicas.....	22
1.2.2	Atividades Anticlastogênica, Antigenotóxica e Antimutagênica.....	24
1.2.3	Atividade Anticarcinogênica.....	25
1.2.4	Atividade Imunomoduladora	27
1.3	CICLO CELULAR E CÂNCER.....	32
1.4	APOPTOSE E CÂNCER	34
1.5	EXTRESS OXIDATIVO E CÂNCER	36
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	REFERÊNCIAS	41
5	ARTIGO 1	51
6	ARTIGO 2	74
7	ARTIGO 3	97
8	CONCLUSÕES FINAIS	118
9	INTERVENÇÕES	119
	ANEXOS	120
	ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	121
	ANEXO B - Aprovação do comitê de ética e pesquisa em seres humanos da UEL	123
	ANEXO C - Protocolo de pesquisa	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, os quais podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Porém a definição bioquímica para esta doença é uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (BRASIL, 2005; BRASIL, 2007).

O câncer de mama emerge como um problema de saúde pública cada vez mais preocupante em todo o mundo, devido ao crescente aumento nas taxas de incidência e de mortalidade associadas a esta desordem. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente e o mais comum entre as mulheres. A cada ano 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama, no Brasil a estimativa de novos casos em 2010 foi de 49.240, sendo a maior causa de óbitos por câncer na população feminina e na região sul do país aparece em primeiro lugar entre as mulheres. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram, por ano, mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo (BRASIL, 2011).

Diversos estudos têm procurado esclarecer e identificar as causas e os possíveis fatores de risco relacionados ao câncer de mama. Alguns desses determinantes estão bem definidos em sua relação causal com a doença e outros ainda estão em fase de investigação. Dentre os principais fatores que predispõem ao câncer de mama, destacam-se sexo feminino, pois pessoas do sexo masculino também podem ser acometidas, idade avançada, herança genética, história prévia de doença nas mamas, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gestação a termo após os 30 anos de idade, exposição a hormônios sexuais femininos, hiperplasia, portadores de alteração no gene BCRA. Além destes, fatores ambientais tais como tabagismo, ingestão dietética, sedentarismo e excesso de peso corpóreo também têm sido investigados como fatores promotores de câncer de mama (MEISTER; MORGAN, 2000; PINHO; BRASIL, 2007; COUTINHO, 2007; BRASIL, 2011).

Atualmente, evidências científicas apontam que a composição corpórea e alguns componentes da dieta podem estar relacionados com aumento no risco de

desenvolvimento (DONALDSON, 2004; KEY et al., 2004; PINHO; COUTINHO, 2007) e progressão do câncer de mama, principalmente por induzirem a geração de espécies reativas de oxigênio no organismo, aumentando, assim, o risco da doença. Por outro lado, a relação entre câncer e componentes alimentares que possam desempenhar papel protetor em relação às neoplasias também tem sido alvo de pesquisas nas últimas décadas (DONALDSON, 2004; KEY et al., 2004; GONZALEZ, 2006).

A estreita relação entre dieta e câncer tem sido demonstrada em diferentes estudos. Componentes dietéticos influenciam eventos genéticos e epigenéticos, modificando o risco de desenvolvimento do câncer e o comportamento tumoral (MILNER, 2006). Nos últimos anos têm sido testados compostos isolados presentes em alimentos de origem vegetal como possíveis agentes anticarcinogênicos, uma vez que investigações epidemiológicas (populacionais) e experimentais (*in vivo* e *in vitro*) têm demonstrado que uma alimentação rica em ácido ascórbico, vitamina E, fitoestrógenos da soja, carotenóides, selênio, zinco, licopeno, flavonóides, e β -glucanas, podem diminuir o risco de diversos tipos de câncer (FLAGG; COATES; GREENBERG, 1995; ZHANG et al., 1999; SCHRAUZER et al., 2000; FERRARI; TORRES, 2002; ROCK; DEMARK-WAHNEFRIED, 2002, MANNION et al., 2011).

Recentes pesquisas têm sugerido que produtos naturais da dieta que apresentam atividades antioxidantes podem contribuir para inibição da proliferação celular e indução de diferenciação celular, interferir nas vias de transdução de sinal e conferir proteção contra o processo cancerígeno que pode ser uma eficiente via de prevenção do câncer. Essa abordagem é conhecida como quimioprevenção (KASSIE et al., 2002; MANTOVANI et al., 2008).

O conceito de quimioprevenção, pelo qual compostos naturais ou sintéticos podem prevenir retardar ou reverter o desenvolvimento de câncer, tem grande relevância clínica. É estimada pela Sociedade Americana de Câncer que um terço de todos os tipos de câncer pode ser prevenido simplesmente pela modificação da dieta, manutenção de peso corporal e atividade física regular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Rock e Demark-Wahnefried (2002), em uma revisão de evidências relacionando nutrição e sobrevivência após diagnóstico de câncer de mama, enfatizam os efeitos benéficos dos nutrientes quimioprotetores presentes na dieta, por meio das atividades antioxidantes, sobre os hormônios gonadais, na diminuição do risco de progressão deste tipo de câncer. Estudo realizado por Demir e colaboradores (2007) na Turquia, utilizando β -glucana de *S. cerevisiae*, administrada oralmente, durante 14 dias, para 23 mulheres com

câncer de mama em estágio avançado, constatou efeito positivo na ativação de monócitos no sangue periférico, bem como estímulo da proliferação destes, melhorando a resposta imune, sem provocar quaisquer efeitos colaterais.

Weitberg (2008) estudou 20 pacientes com diferentes neoplasias avançadas submetidos a quimioterapia, utilizando uma preparação contendo $\beta(1,3)/(1,6)$ D-glucana, administrada oralmente, duas vezes por dia. Os pacientes foram monitorados quanto a tolerabilidade e os efeitos adversos a cada duas semanas e hemograma uma vez por mês durante 6 meses. Foi constatado que a β -glucana foi bem tolerada pelos pacientes que ainda relataram sensação de bem estar. Em relação ao hemograma observou-se melhora significativa da hematopoiese. Este efeito positivo deve ser mais bem estudado porque, se confirmado, a β -glucana poderia se tornar um importante adjuvante no tratamento de pacientes submetidos à quimioterapia, limitando as citopenias comumente observadas com essas terapias.

No entanto, as β -glucanas de diferentes origens apresentam ações diferenciadas, por exemplo, a β -glucana de cereais (aveia) é usada principalmente em pesquisas relacionadas às doenças cardíacas, síndrome metabólica e diabetes. Por outro lado, a β -glucana de leveduras é mais utilizada para melhorar o sistema imunológico e assim reduzir o risco de câncer e evitar infecções, além de potencializar a ação da quimioterapia ou radioterapia, sem agravar os efeitos colaterais e assim contribuir positivamente para o aumento da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes com câncer (FENG et al., 2003; KIM et al., 2006; Maki et al., 2006).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DA B-GLUCANA

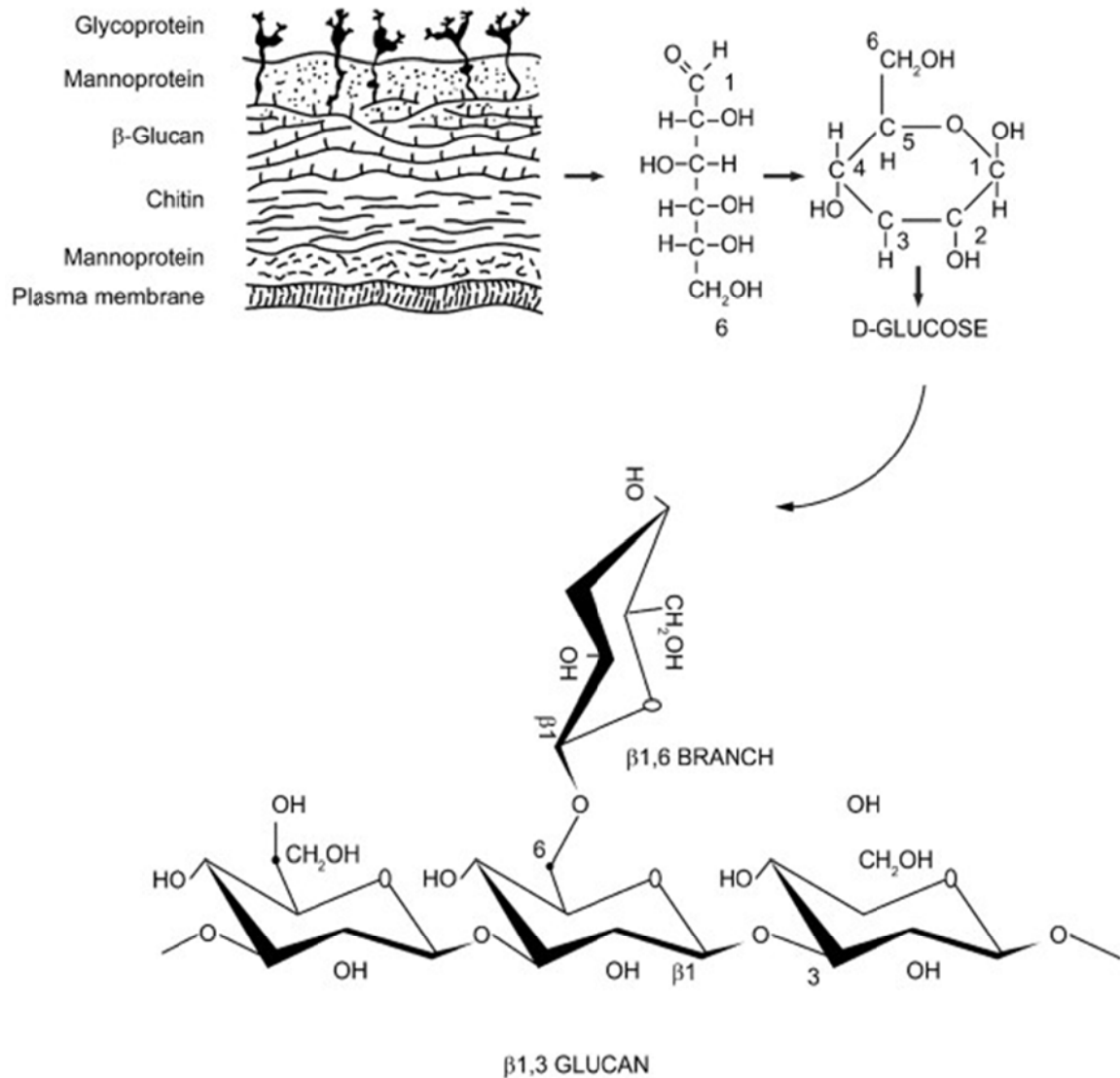
As β -glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia. Dentre os polissacarídeos encontrados na parede celular fúngica, as glucanas são os homo polissacarídeos mais comuns. A maioria é linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa (α) ou beta (β). As β -glucanas são a forma predominante, podendo estar livres ou associadas às proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos. A conformação destas moléculas pode variar desde simples até tripla hélice, que é a forma mais comum, onde três cadeias de polímeros são agregadas por ligações de

hidrogênio nos oxigênios do C-2 (SANDULA; MACHOVÁ; HRIBALOVÁ, 1995; WILLIAMS, 1997).

A β -glucana da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) é constituída 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 (Figura 1). 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 (SANDULA; MACHOVÁ; HRIBALOVÁ, 1995).

Duas frações de β (1-3) glucana são encontradas na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo uma solúvel e outra insolúvel. A porção insolúvel contém de 3 a 6% de ramificações unidas em β (1-6) e representa o maior componente da parede. A porção solúvel, que representa de 15 a 20% tem estrutura semelhante a insolúvel, porém com maior número de ramificações β (1-6) (MANNERS et al., 1973; SHAHINIAN; BUSSEY, 2000).

Figura 1 - Estrutura da β -glucana



Nota: A subunidade básica da β -glucana fúngica é a β -D-glicose ligadas uma a outra por uma cadeia glicosídica $\beta(1\rightarrow3)$, com ramificações $\beta(1\rightarrow6)$.

Fonte: CHAN; CHAN; SZE, 2009.

A extração de β -glucana para a utilização terapêutica é geralmente feita a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e do fungo *Lentinula edodes* e os produtos têm sido comercializados como Betafectin® e Lentinan® respectivamente (CISNEROS et al., 1996; ZIMMERMAN et al., 1998; MASIHI, 2000). Alguns tipos de β -glucanas já estão licenciados para o uso terapêutico no Japão e foram utilizadas como adjuvantes na terapia antitumoral (KANENO et al., 1989).

Estudos clínicos e epidemiológicos realizados na última década, sugerem que as β -glucanas atuem principalmente nos efeitos hipolipemiantes, redução da glicemia, redução de peso, modulador imunológico, e efeitos anticarcinogênico, conferindo a esse

composto também uma importante ação protetora contra o risco de doenças crônicas não transmissíveis (KERCKHOFFS; HORNSTRA; MENSINK, 2003; ZEKOVIC et al., 2005; SULLIVAN; SMITH; ROWAN, 2006;).

1.2.1 Propriedades Biológicas

A atividade biológica da β -glucana vem sendo estudada com atenção nos últimos anos especialmente pela habilidade em ativar mecanismos de defesa exercendo proteção contra infecções. Além disso, outros efeitos já foram comprovados: antitumorais, antiinflamatório, antimutagênico, hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (Tabela 1) (LIN et al., 2004; BEHALL et al., 2006; KIM et al., 2006; QUEENAN et al., 2007; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; HYUNSOOK et al., 2009).

Tabela 1 - Estrutura, origem e atividade biológica da β -glucana

Structure	Source	Effects
β (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Antiparasitic
		Antibacterial
		Antiviral
		Antifungal
		Antimutagenic/antigenotoxic
		Antitumoral
		Hematopoietic stimulator
		Mitogenic
		Imunostimulating activity
		Antitumoral
β (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)	<i>Candida albicans</i>	Cytokine induction
		Antimutagenic/antigenotoxic
	<i>Poria cocos</i>	Inhibition of CYP450 isoenzymes
		Antitumor
	<i>Agaricus blazei</i>	Inhibition of CYP450 isoenzymes
		Antitumor
	<i>Lentinus edodes</i>	Antitumor
		Antitumor
	<i>Schizophyllum commune</i>	Antitumor
		Antitumor
<i>Coriolus versicolor</i>	Antitumor	
	Antitumor	
β (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)	Oat	Antimicrobial
	Barley	Antiparasitic
		Hypocholesterolemic
		Anti-thrombotic
		Antimutagenic

Fonte: Adaptado de Mantovani et al. (2008)

Entre os diferentes tipos de β -glucanas, o políssacarídeo derivado da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), é a classe mais estudada e com maior efeito biológico (VETVICKA, 2001).

A β -glucana é designada como um modificador da resposta biológica, pois, ao ser reconhecido pelo organismo desencadeia uma série de eventos na resposta imune inata e adaptativa (AKRAMIENÉ, 2007). Agem por meio da estimulação do sistema imune do hospedeiro exercendo um efeito benéfico sobre uma variedade de infecções de origem bacteriana (TZIANABOS; CISNEROS, 1996), viral (REYNOLDS et al., 1980), fúngica (MEIRA et al., 1996) e parasitária (HOLBROOK et al., 1981). Este composto também está descrito como modulador, tanto da imunidade humoral quanto da celular (FALCH et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; KUBALA et al., 2003); sua eficiência está comprovada em infecções, tumores e como estimulador da hematopoiese (HOFER; POSPISIL, 1997; KOGAN et al., 2002; WEITBERG, 2008).

Alguns pesquisadores a consideram uma candidata promissora como agente imunostimulatório para pacientes imunocomprometidos ou infectados com bactérias multidroga-resistentes (KULICKE; LETTAU; THIELKING, 1997), pois existem relatos a respeito da ativação de macrófagos (TSIAPALI et al., 2001), neutrófilos (RANKIN et al., 1990) e células Natural Killer (DI RENZO et al., 1991). Kim e Yun (2006) descrevem que a β -glucana obtida da parede celular de leveduras parece ser mais efetiva do que aquelas obtidas de outras fontes.

É importante destacar que 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, hipoglicêmico, e redutor do risco de doenças crônicas (KIM et al., 2005; QUEENAN et al., 2007; HYUNSOOK et al., 2009;). Ensaio clínico randomizado duplo cego, realizado com 97 pacientes hipertensos verificou a influência positiva do consumo de 7,5 gramas de β -glucana de aveia sobre os níveis de insulina pós-prandial e a redução significativa da pressão arterial nos indivíduos obesos (MAKI et al., 2006).

A administração oral pode apresentar vantagens, embora o alto peso molecular e a estrutura complexa da β -glucana possam interferir na absorção pelo trato gastrointestinal. De acordo com Tsukada et al. (2003), a administração oral de β -glucana extraída de *S. cerevisiae* realça as funções dos linfócitos intra-epiteliais do intestino e, portanto, pode ser absorvida pelo mesmo.

No estudo de Queenan et al (2007), conduzido com 75 homens e mulheres hipercolesterolêmicos, foram suplementados com 6 gramas/dia de aveia ou 6 gramas/dia de dextrose (controle). Os indivíduos foram avaliados e acompanhados durante 6 semanas e os

resultados mostraram que o grupo que recebeu aveia (fonte de β -glucana) reduziu significativamente o colesterol total e o LDL colesterol.

1.2.2 Atividades Anticlastogênica, Antigenotóxica e Antimutagênica

Além das propriedades anteriormente descritas, as β -glucanas também despertam o interesse de pesquisadores na área de genética, especialmente na subárea de mutagênese. Atualmente a pesquisa por substâncias naturais que possam reduzir a frequência de alterações no DNA (ácido dextrorribonucleico) tem se mostrado promissora e com importantes implicações na prática terapêutica devido à possibilidade da redução da taxa de mutações e conseqüente redução na incidência de câncer.

Segundo Grüter et al. (1990) e Waters et al. (1989), 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.

Substâncias com ação antimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA. Agem aumentando a fidelidade na replicação, estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos o erro (HARTMAN; SHANKEL, 1990; DE FLORA, 1998; SIMIC et al., 1998).

As substâncias desmutagênicas, por sua vez, são capazes de inativar um agente mutagênico, pela atuação do composto diretamente no agente mutagênico, ou em seus precursores, inativando-os por ação química ou enzimática (HARTMAN; SHANKEL, 1990; FERGUSON, 1994; DE FLORA, 1998).

Alguns estudos realizados com β -glucana, tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstraram sua eficácia significativa na prevenção de efeitos mutagênicos causados por agentes tais como o peróxido de hidrogênio (SLAMENOVA et al., 2003), doxorrubicina (LIN et al., 2004) e ciclofosfamida (CHORVATOVICOVA et al., 1996; CHORVATOVICOVA et al., 1998; TOHAMY et al., 2003).

Os efeitos antigenotóxicos da β -glucana também foram demonstrados por Tohamy e colaboradores (2003) em camundongos que receberam ciclofosfamida, doxorrubicina e cisplatina. Estes pesquisadores relataram que camundongos que receberam 2,5 mg/kg peso corpóreo de ciclofosfamida, 12,0 mg/kg peso corpóreo de doxorrubicina e 5,0 mg/kg peso corpóreo de cisplatina (i.p.) quando comparados àqueles que foram pré-tratados

com 100 mg/kg peso corpóreo 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, 55,0 e 57,1% em espermatozóides, 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.

Oliveira e colaboradores (2007) verificaram a atividade antimutagênica do polissacarídeo β -glucana, extraída da cevada, sugerindo um mecanismo de ação tanto por desmutagênese quanto por bioantimutagênese. Esta determinação do mecanismo de ação poderá gerar modificações em condutas terapêuticas frente a tratamentos quimioterápicos, já que em um futuro próximo a β -glucana poderá se tornar um adjuvante importante na quimioterapia por ser capaz de diminuir os efeitos adversos da mesma, como é o caso dos efeitos clastogênicos.

1.2.3 Atividade Anticarcinogênica

Os anticarcinogênicos são substâncias capazes de impedir, retardar ou reduzir o surgimento ou desenvolvimento de tumores e podem ser classificados em substâncias que inibem: (I) a formação de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos a partir de precursores; (II) a chegada do carcinógeno às células específicas, também denominadas agentes de bloqueio; (III) a expressão de características malignas, sendo também chamados de agentes supressores (KURODA; HARA, 1999). Neste aspecto, a introdução de substâncias naturais com ação biomoduladoras combinadas com quimioterápicos contribuiu significativamente para a terapia antineoplásica. Dentre os compostos conhecidos como imunomoduladores, as β -glucanas extraídas da parede celular de fungos e de leveduras vem sendo utilizadas por sua atividade antitumoral (HONG et al., 2003; MIADOKOVÁ et al., 2005; GÖKSEL et al., 2006).

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes e 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 (KAISER; KERNODLE, 1998; FERRARI; TORRES, 2002).

Ferrari e Torres (2002) descreveram várias substâncias com ação anticarcinogênica. O ácido fólico, presente principalmente no espinafre, brócolis e alface, está descrito como capaz de auxiliar no reparo de lesões do DNA. As catequinas, encontradas no chá verde e preto, promovem inibição do citocromo P450 e da cicloxigenase, e ainda promove a inibição de angiogênese e induzem apoptose de células tumorais, em especial as prostáticas. 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. O selênio e a vitamina E apresentam propriedades semelhantes e são capazes de promover imunostimulação e diminuição das espécies de oxigênio reativas. A vitamina E está presente 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 fator de crescimento insulina símile (IGF-I) e da angiogênese, além de ativar apoptose pela indução das caspases e inibição da telomerase, e indução de diferenciação do fator de crescimento transformante- β (TGF- β).

Os estudos iniciais sobre o potencial uso da β -glucana contra o câncer foram realizados na década de 70. Em 1979, Di Luzio et al. demonstraram que a preparação de β -glucana de *S. cerevisiae* reduziram significativamente o crescimento de carcinomas mamários e melanomas B16. No mesmo estudo foi constatado aumento da sobrevivência de camundongos com implante tumoral subcutâneo. Demir et al. (2007) realizaram estudo na Turquia, onde a β -glucana de *S. cerevisiae* foi administrada oralmente, durante 14 dias, para 23 mulheres com câncer de mama em estágio avançado. Foi constatada ativação de monócitos no sangue periférico, bem como estímulo da proliferação destes. Os exames clínicos não evidenciaram quaisquer efeitos colaterais decorrentes do uso via oral da β -glucana.

Oliveira et al. (2007) comprovaram o efeito da β -glucana de *S. cerevisiae* contra lesões no DNA, induzidas pelo metilmetano sulfonado, em células ovarianas de hamsters chineses. A β -glucana foi testada com pré, simultâneo e pós-tratamento ao agente mutagênico. Os efeitos quimiopreventivos da β -glucana foram observados em todas as situações de tratamento, com índices de redução de danos ao DNA variando de 35 a 57,3%.

Inúmeras pesquisas realizadas, principalmente no Japão, comprovaram que a β -glucana de levedura realça os efeitos do tratamento quimioterápico e melhora a qualidade da sobrevivência com pacientes de câncer tratados com radiação (KIM et al., 2006a; KIM et al., 2006b). Dessa forma já existem no país, algumas β -glucanas licenciadas para uso terapêutico como adjuvantes na terapia antitumoral.

Recentemente, Ishii et al., (2011) trataram camundongos machos expostos a 1,2-dimethylhydrazine (DMH) com *Agaricus Blazei* in natura (suplementado na ração), rica fonte de β -glucana. Os referidos pesquisadores utilizaram os protocolos de tratamento pré e pós-tratamento o que podem caracterizar a ação bioantimutagenica e o protocolo de tratamento simultâneo que indica atividade tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese, além do protocolo de tratamento contínuo que necessariamente somaria as duas atividades. Os resultados do grupo de pré-tratamento mostraram redução de dano de 54,6%, no grupo de pré-tratamento e tratamento contínuo a redução foi de 50,45% na incidência de danos pré-neoplásicos, demonstrando que a β -glucana de cogumelo age de forma quimiopreventiva.

Yamamoto et al. (2009) também relataram que β -glucanas de fungos são capazes de induzir a supressão da angiogênese e a metástase quando administradas oralmente em modelos animais.

O uso diário de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos, futuramente, será o procedimento mais efetivo para prevenir o câncer e as doenças genéticas humanas. Segundo Gomes et al. (1996) e Surh et al. (1996), o uso diário de produtos antimutagênicos ou anticancerígenos dá-se o nome de quimioprevenção. Para conseguir 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 preferência de baixo custo (FERGUSON, 1994). Entretanto Chan, Chan e Sze (2009) relataram que as β -glucanas de diferentes tamanhos e padrões de ramificação, podem ter ação imune variável e resultar em inúmeros efeitos clínicos.

Dessa forma, Xiao, Trincado e Murtaugh (2004) questionam se a ação das β -glucanas sobre a atividade antitumoral se dá pela ativação ou aumento da resposta imune do hospedeiro, por meio da ativação de leucócitos e produção de citocinas inflamatória, ou possa ser uma combinação de todos estes fatores. Para entender melhor esse grau de variação, e definir os mecanismos de ação antitumorígenicos das β -glucanas, mais pesquisas são necessárias.

1.2.4 Atividade Imunomoduladora

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando à otimização do processo de obtenção da β -glucana a partir da parede celular de *S. cerevisiae*.

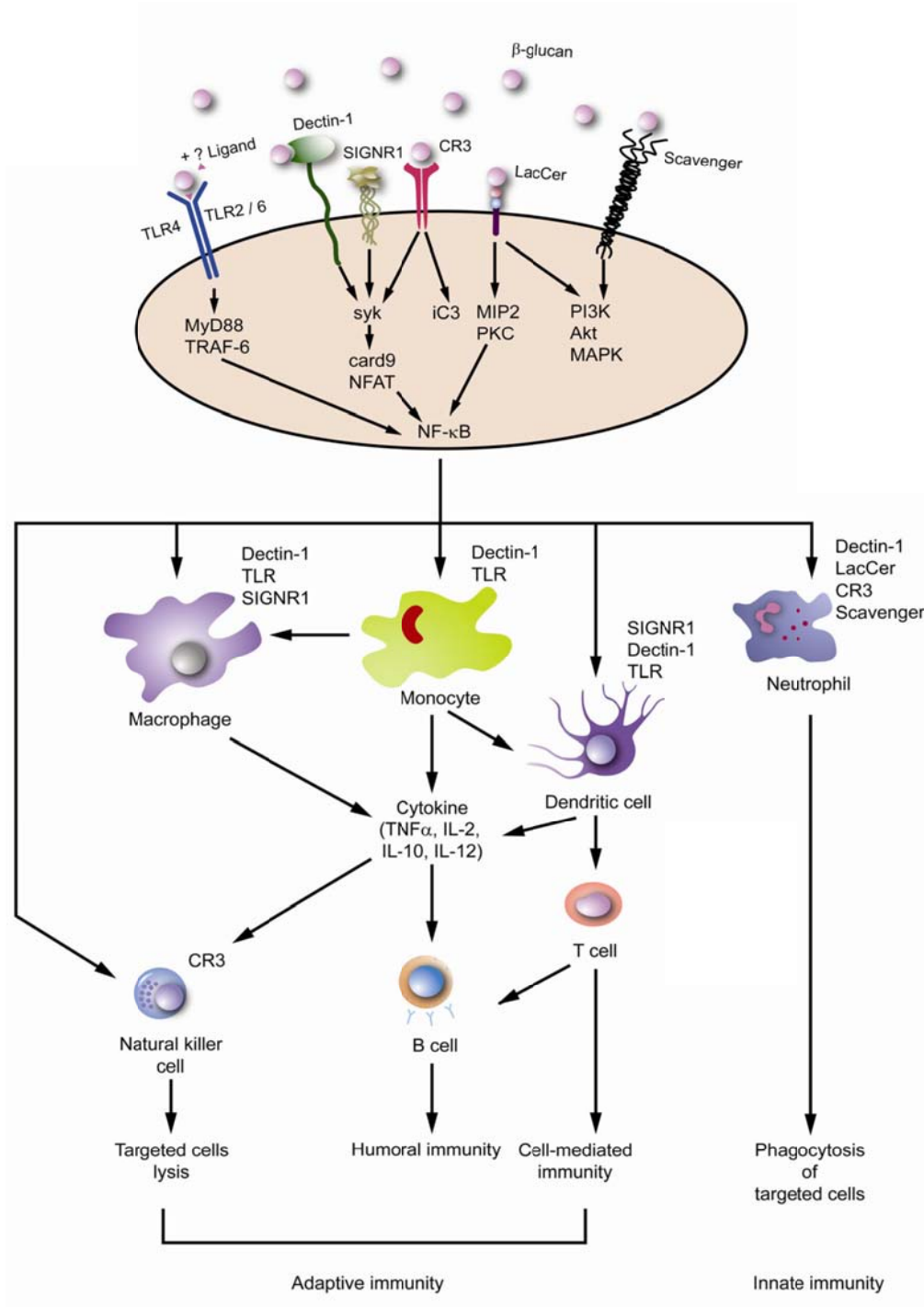
Além disso, há um crescente interesse na identificação das características estruturais e biológicas da β -glucana e seus derivados, na expectativa de viabilizar seu uso, aproveitando seu potencial imunestimulante.

A β -glucana é designada como um modificador da resposta biológica, pois, ao ser reconhecido pelo organismo possui a capacidade de desencadear uma série de eventos na resposta imune (CHAN et al, 2008; CHAN; CHAN; SZE, 2009). As respostas à β -glucana em vertebrados têm início com o reconhecimento por receptores presentes na superfície celular (BROWN; GORDON, 2001; BROW et al., 2002). A modulação da β -glucana inclui a ativação de monócitos, macrófagos, células dendríticas, células natural killer e neutrófilos (BROWN; GORDON, 2001; XIAO; TRINCADO; MURTAGH, 2004; MOON et al., 2005; CHAN et al., 2008; CHAN; CHAN; SZE, 2009) e estímulo da hematopoiese (HOFER; POSPISIL, 1997; WEITBERG, 2008). As funções imunomoduladoras induzida por β -glucanas envolvem tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. Além de aumentar a fagocitose e desencadear a liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e vários tipos de interleucinas.

Conforme Tokunaka et al. (2002), o reconhecimento da β -glucana pelos receptores pode ser influenciado pelo peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização da β -glucana. Também a conformação do polímero em solução foi sugerida por Chorvatovicová, Machová e Sandula (1996) como um importante fator para a ligação aos receptores de uma dada atividade biológica.

Os macrófagos e células dendríticas possuem receptores de superfície celular típico chamado de receptor padrão de reconhecimento (PRRs) que detectam moléculas inatas não reconhecidas, incluindo organismos patogênicos associados a padrões moleculares (PAMPs) (BROWN; GORDON, 2005). As β -glucanas podem agir como PAMPs e são reconhecidas por PRRs, uma vez que essas moléculas não podem penetrar diretamente a membrana celular, devido ao seu grande peso molecular (CHEN; SEVIOUR, 2007). Os PRRs principais para β -glucanas podem ser dectin-1 e o receptor Toll-like (TLR). Após a ligação com a molécula de β -glucana, dectin-1 e TLR pode induzir uma cascata de sinalização e ativar células do sistema imunológico BROWN; GORDON, 2005. (Figura 2).

Figura 2 - Ativação imune induzida pela β -glucana



Legenda: A resposta à β -glucana tem início com o reconhecimento por receptores presentes na superfície celular ativando monócitos, macrófagos, células dendríticas, células natural killer e neutrófilos.

Fonte: Chan, Chan e Sze (2009).

Em 2002, estudo conduzido por Brown et al definiu a contribuição de vários receptores ao reconhecimento de β -glucanas. Os autores usaram *zymosan*, uma partícula derivada de levedura composto principalmente de polissacarídeos β -glucanas, que apresenta efeitos desejáveis sobre a função imunológica, incluindo a capacidade de conferir resistência a

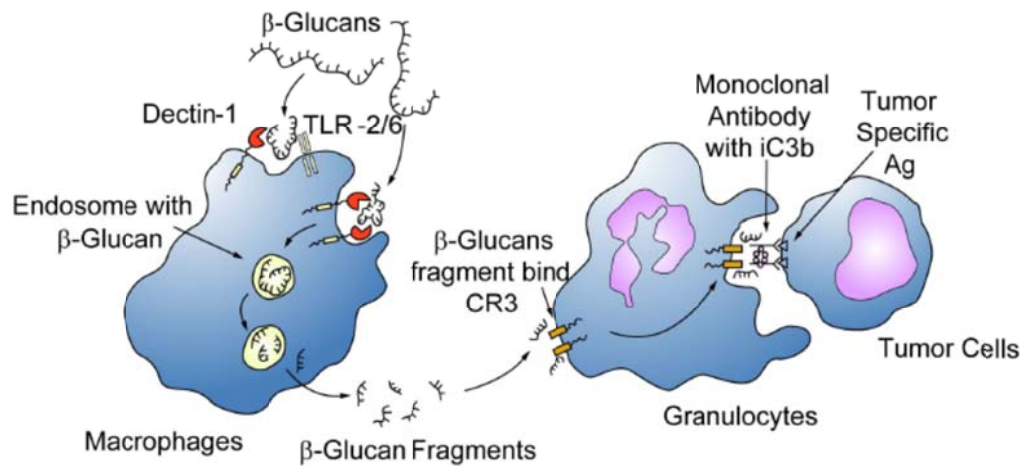
tumores e várias infecções. Este estudo incidiu sobre a capacidade de partículas de β -glucanas estimular as células do sistema reticuloendotelial, utilizando reagentes específicos, o estudo foi capaz de definir os receptores envolvidos no reconhecimento de β -glucanas em macrófagos primários.

Chan et al. (2008) realizaram um estudo experimental com cogumelo *Agaricus Blazei*, uma das principais fontes de β -glucana e concluíram que *A. Blazei* aumentou significativamente a atividade de fagócitos, macrófagos e monócitos demonstrando a capacidade apreciável deste cogumelo, em modular a função do sistema imunológico nos animais avaliados, confirmando seu potencial imunomodulador.

Os receptores relacionados ao reconhecimento da β -glucana em vertebrados foram primeiramente identificados na superfície de monócitos por Czop e Austen em 1985 como opsonina independente de receptores para ativadores de partículas da via alternativa de ativação do complemento (CZOP; AUSTEN, 1985). Até agora, quatro receptores de β -glucana foram identificados: Dectin-1 (BGR), Receptor do Sistema Complemento 3 (CR3), lactosilceramida e receptores neutralizadores. O mecanismo de resposta parece ser mediado pela combinação destes (BATTLE et al., 1998; BROWN; GORDON, 2001; BROW et al., 2002).

As moléculas de β -glucanas são capturadas pelos macrófagos por meio da Dectin-1 receptor com ou sem TLR-2/6. A grande molécula de β -glucanas é então internalizada e fragmentada em pequenos fragmentos dentro dos macrófagos. Eles são levados até a medula do sistema reticular endotelial e, posteriormente, liberado. Estes pequenos fragmentos de β -glucanas são eventualmente tomadas pelos granulócitos, monócitos e macrófagos circulantes, por meio do complemento receptor (CR3). A resposta imune, então, será acionada e uma das ações é a fagocitose do anticorpo monoclonal das células tumorais alvo (CHAN; CHAN; SZE, 2009) (Figura 3).

Figura 3 - Captação e ações subsequentes de β -glucanas em células do sistema imunológico



Fonte: Chan, Chan e Sze (2009)

A expressão da dectin-1 é predominante em monócitos, macrófagos, linhagens de neutrófilos e células dendríticas, sendo significativamente influenciada por citocinas e produtos microbianos (WILLMENT; GORDON; BROWN, 2001; TAYLOR et al., 2002). Embora seja expressa de forma heterogênea nos tecidos, dectin-1 é um receptor que tem distribuição consistente com a tarefa de vigilância contra patógenos (REID et al., 2004). Esta glicoproteína reconhece β -glucanas solúveis e particuladas, incluindo partículas fúngicas intactas e também possui um ligante para células T (ARIIZUMI et al., 2000; STEELE et al., 2003).

O receptor Dectin-1 é uma proteína transmembrana que se liga a fração β -1,3 e β -1,6 das glucanas e pode iniciar e regular a resposta imunológica inata (BROWN et al., 2003; HERRE; GORDON; BROWN, 2004; SUN; ZHAO, 2007). Ele reconhece as β -glucanas encontradas na parede celular bacteriana ou fúngica. Em seguida, este aciona de forma eficaz a resposta imune, incluindo fagocitose e produção de fatores pró-inflamatórios, o que leva à eliminação de agentes infecciosos (BROWN, 2006; SCHOREY; LAWRENCE, 2008).

Novas pesquisas poderiam ser feitas sobre o possível mecanismo de ação das β -glucanas, em especial os estudos sobre os receptores do sistema imune inato e as cascatas de sinalização que regulam a expressão de genes relacionados com a co-estimulação de moléculas e a atividade de apresentadora de antígenos, influenciando diretamente a resposta imune inata e adaptativa (SYED, 2009).

1.3 CICLO CELULAR E CÂNCER

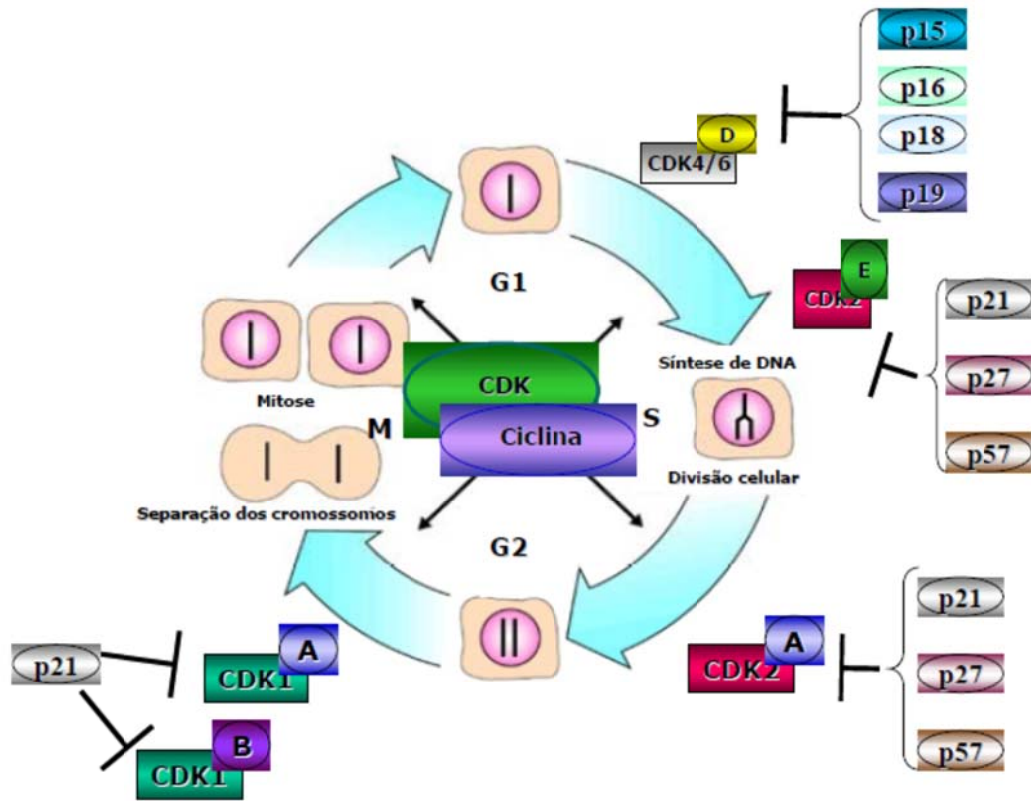
Segundo a oncologia molecular, o câncer é o resultado final de um acúmulo de alterações genéticas, algumas das quais podem ser adquiridas e outras herdadas. Os genes que são alterados são aqueles envolvidos nos processos celulares normais e fundamentais, como regulação do ciclo celular, a sinalização, e a diferenciação (PELÚZIO et al., 2006).

O ciclo celular constitui um processo irreversível e dinâmico controlado por sinais intracelulares e extracelulares os quais permitem que todo o DNA contido na célula mãe seja replicado sem erros durante a fase S (síntese) e segregado a duas células filhas durante a fase M (mitose), com a garantia de fidelidade de todo material genético (MOLINARI, 2000). Entre as fases S e M, existem intervalos (“Gaps”) denominados G1, anterior à fase S e G2 anterior à fase M. O controle da expressão gênica e da atividade das proteínas envolvidas na sinalização do início e término de cada uma das fases é de extrema importância para que uma fase comece apenas quando a anterior estiver concluída.

O controle do ciclo celular, denominado de *checkpoint* (ponto de controle), representa um mecanismo de vigilância cujo papel principal é o de evitar o acúmulo de erros genéticos durante as divisões celulares, dessa forma protegendo a integridade genômica das células. Para garantir a fidelidade da duplicação, os *checkpoints* desempenham algumas tarefas: induzem um retardo no ciclo celular; ajudam a ativar o reparo do DNA; bloqueiam o ciclo celular até que o reparo seja feito com sucesso e reiniciam a progressão do ciclo (SHERR, 2000; MALUMBRES; BARBACID; MARIANO, 2009).

Os principais componentes desse sistema de controle consistem em duas famílias de proteínas: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs fosforilam diversas proteínas ativando umas e inibindo outras para coordenar suas atividades. Cada CDK é inativa até que se ligue a uma ciclina, e esta ligação faz com que a CDK passe a fosforilar as proteínas (mais especificamente nos resíduos de serina e treonina) necessárias para determinada etapa do ciclo celular (RANG et al., 2003) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema simplificado da regulação do ciclo celular



Nota: Progressão do ciclo celular regulada pelos diferentes complexos ciclina/CDKs. Os complexos ciclina/CDKs são negativamente controlados pelos inibidores quinase dependente de ciclina (CDKIs) controlando a progressão do ciclo celular durante os intervalos de transição (G1 e G2), das fases de síntese (S) e da mitose (M).

Fonte: Adaptado de GUIMARÃES; HAINAUT, 2002.

Nos últimos anos, as funções das ciclinas e quinases dependentes de ciclinas têm sido investigadas quanto a inibição do ciclo celular e como alvo para o tratamento do câncer (PAGANO et al., 1992; MOTOKURA; ARNOLD, 1993; HALL; PETERS, 1996; COLLECCHI et al., 2000). MÈULLER-TIDOW et al (2003) estudou a superexpressão de ciclina A1 em células germinativas tumorais de testículo e sugeriram que essa ciclina tem uma função no ciclo celular independente na carcinogênese e mostraram que sua atividade está altamente expressas em câncer avançado de próstata e que sua expressão está associada à histologia do tumor. No entanto, o papel preciso da ciclina A1 na patogênese primária do câncer de próstata metastático, em grande parte, ainda é desconhecido.

1.4 APOPTOSE E CÂNCER

Apoptose, conhecida como morte celular programada, é um elemento essencial do processo fisiológico normal para a manutenção da homeostase celular, é uma forma de morte celular desencadeada durante uma variedade de condições fisiológicas e é estreitamente regulada por um número de genes que promovem ou bloqueiam a morte celular em diferentes estágios. A fragmentação do DNA é um dos traços característicos das células apoptóticas (OLTVAI et al., 1993; CUMMINGS et al., 2004; ZHANG et al., 2006).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, de privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000; OKADA; MAK, 2004).

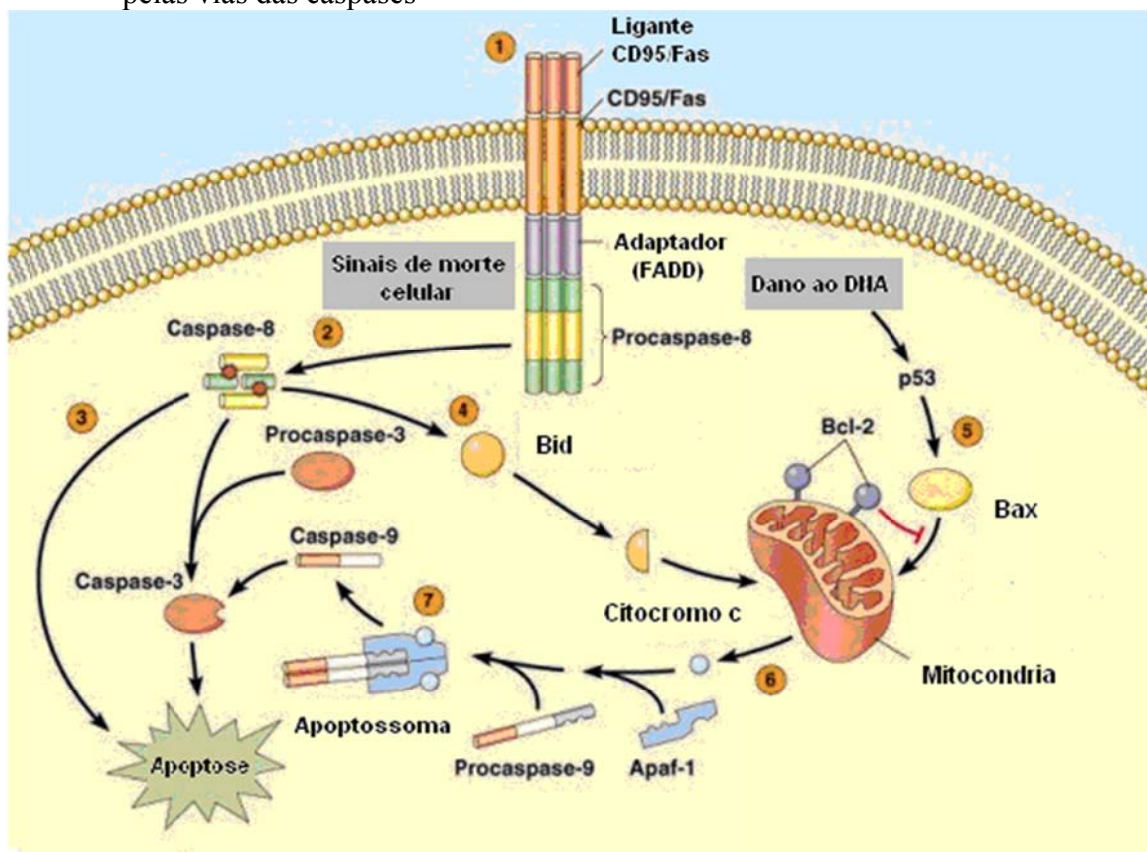
Segundo Makin e Hickman (2000), a insensibilidade aos estímulos apoptóticos é uma das seis alterações fisiológicas presentes no fenótipo tumoral e o mecanismo molecular pelo qual ela pode ser desencadeada vem sendo amplamente estudado para melhor compreensão da carcinogênese e das respostas terapêuticas encontradas em tumores sólidos.

Alguns genes estão envolvidos nos mecanismos de apoptose, seja como protetores ou como promotores (BUDIARDJO et al., 1999). A maioria dos estímulos desencadeia a apoptose por ação das caspases, grupo de enzimas proteolíticas (*cysteinil aspartate specific proteases*) sintetizadas como pró-enzimas inativas. Dentre as 14 caspases humanas descritas até o momento, seis caspases (3, 6, 7, 8, 9 e 10) participam de apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel no apoptose. Caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUPNARAIN et al., 2004).

Alguns estudos indicam que durante apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria. Por meio desse poro ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da ativação do apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras do apoptose para o citosol.

Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossoma, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003; SHIOZAKI; SHI, 2004; BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; FULDA; DEBATIN, 2006; CONTRACT, 2009) (Figura 5).

Figura 5 - Visualização simplificada do mecanismo de morte celular por apoptose mediado pelas vias das caspases



Fonte: Adaptado de Hohenegger (2011)

Estudo recente realizado por Kim e colaboradores (2009) investigaram os efeitos apoptóticos da β -glucana derivada de bactéria, em células humanas de câncer de cólon (SNU-C4) por meio da via de ativação de caspase-3. Os resultados demonstraram que a β -glucana induziu apoptose das células SNU-C4, inibiu a proliferação celular, alterou a morfologia celular e a expressão dos genes de apoptose e aumentou a atividade da enzima caspase-3. Os pesquisadores concluíram que a β -glucana pode ser uma substância natural benéfica para o tratamento do câncer de cólon e quimioprevenção.

Outro estudo realizado por Zhang et al (2006) avaliou o efeito inibitório do crescimento de células de carcinoma de mama humano (MCF-7) promovido pela β -glucana

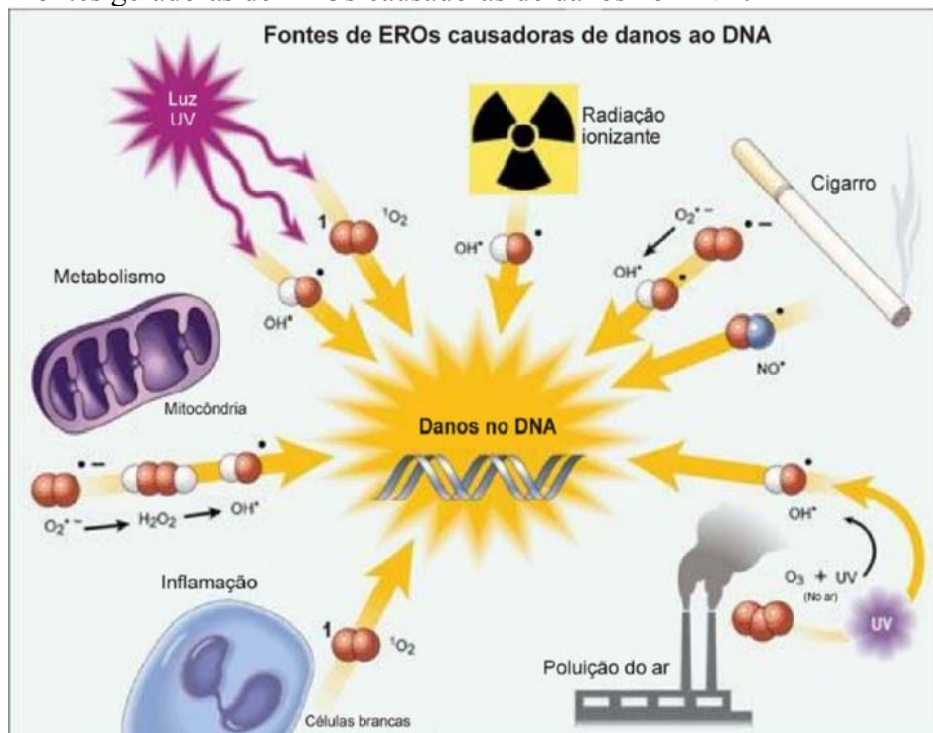
derivada do micélio *Poria cocos*. Os resultados do estudo forneceram dados preliminares sobre o modo de ação da β -glucana solúvel e perspectivas de sua atuação como um agente antitumoral, atuando na suspensão do ciclo celular (fase S) e induzindo apoptose.

1.5 EXTRESS OXIDATIVO E CÂNCER

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos normais do metabolismo celular e sua presença nas células pode ser benéfica ou não dependendo da concentração em que estão presentes. Quando encontradas em concentrações medianas, concentração esta que podem variar de acordo com o tipo celular, a presença das EROs é importante para a defesa contra agentes infecciosos, sistemas de sinalização celular e indução da divisão celular (VALKO et al., 2006).

Vale destacar, que espécies reativas também podem ser geradas por meio de fontes exógenas, tais como medicamentos, radiações gama e ultravioleta, tabaco, poluentes ambientais e dieta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 6).

Figura 6 - Fontes geradoras de EROs causadoras de danos no DNA.



Fonte: Modificado de Skin (1998)

Os danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, tais como inflamações, artrites reumáticas, aterosclerose, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, problemas pulmonares, entre outros (SIES, 1993; FANG et al., 2002). Os danos mais graves causados pelas EROs são aqueles relacionados ao DNA e RNA (ácido ribonucléico) (BARREIROS et al., 2006). Mutações no material genético resultam em bases oxidadas, representando o primeiro passo nos processos de mutagênese e envelhecimento (VALKO et al., 2004).

Os danos oxidativos causados pelas EROs no DNA incluem a clivagem de ligações fosfodiéster, modificação dos açúcares, ligação cruzada entre fita dupla e simples e ainda oxidação e/ou modificação das bases do DNA, sendo estas últimas lesões citadas as mais envolvidas com formação e propagação do câncer (RIBEIRO et al., 2006).

O sistema de defesa humano inclui antioxidantes produzidos no próprio organismo e, também, outros obtidos por meio de fontes externas (dietéticas). Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos ou não enzimáticos, conforme a estrutura do agente antioxidante. Os principais antioxidantes enzimáticos existentes no organismo humano são a enzima superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A enzima SOD está presente no organismo de duas formas distintas: cobre/zinco-dependente (Cu/Zn-SOD) e manganês-dependente (Mn-SOD). São metaloenzimas abundantes que agem sobre o radical O_2 , dismutando-o a H_2O_2 , que é menos reativo, e pode ser degradadas por outras duas enzimas como catalase e glutathione peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; BOREK, 2004).

O gene SOD1 (Cu, Zn-SOD citoplasmática) por sua vez, fornece instruções para a produção da superóxido dismutase, que é abundante nas células. Esta enzima neutraliza moléculas carregadas de oxigênio (radicais superóxido), que podem danificar as células se seus níveis não são controlados. Os radicais superóxido (EROS) são subprodutos de processos celulares normais, especialmente das reações de produção de energia que ocorrem nas mitocôndrias (BARREIROS et al., 2006). Uma mutação no gene SOD1 pode resultar em deficiência da capacidade de neutralizar os EROS e, assim, levar a um desequilíbrio na homeostase, deixando às células mais vulneráveis a ação de produtos tóxicos, principalmente os radicais livres (MIANA-MENA et al., 2010).

O aumento nos níveis de EROs leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e a resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via inicial importante

uma vez que as EROs induzem a ativação de caspases-9 e 3 (GOTTLIEB, 2001; ANAZETTI; MELO, 2007).

Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Entre estes, a resistência à morte por apoptose em células que escaparam do controle do crescimento e da diferenciação normais exercidos por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular até aquela induzida por lesões no DNA, por hipóxia ou por espécies reativas de oxigênio (ZORNIG et al., 2001).

Algumas pesquisas apoiam a idéia de que substâncias que alteram a expressão de SOD1 ou sua função podem vir a ser úteis na sensibilização de células tumorais a alguns medicamentos quimioterápicos (HUANG et al., 2000; BLANDER et al., 2003).

Dentre os componentes não enzimáticos de defesa antioxidante, destacam-se algumas vitaminas, minerais e flavonóides, tais como vitamina A, vitamina C, vitamina E, carotenóides, selênio, zinco, manganês, entre outros, os quais são capazes de restringir a propagação das lesões causadas pelas espécies reativas de oxigênios (MAXWELL, 1995; BIANCHI; ANTUNES, 1999; PAPAS, 1999; BARREIROS et al., 2006). Estes antioxidantes podem ser adquiridos pela dieta, sendo consideradas fontes naturais de antioxidantes.

Alguns estudos reportam que fatores nutricionais ou determinados padrões dietéticos, podem estar diretamente relacionados ao estresse oxidativo em pacientes oncológicos, podendo desempenhar fator determinante ou de proteção em relação ao estresse oxidativo e câncer (DEMARK, 2002; DONALDSON, 2004; ROCK). Os componentes dietéticos protetores mais investigados e discutidos em relação ao estresse oxidativo e câncer de mama são as frutas, verduras e legumes (PIERCE et al., 2004; THOMSON et al., 2005).

Nesse sentido torna-se importante enfatizar que um padrão dietético adequado pode contribuir positivamente na prevenção do câncer. A *Mediterranean Diet Food Pyramid* enfatiza o consumo de leguminosas e oleaginosas como fonte de proteína; a ingestão diária de azeite de oliva, frutas e vegetais queijos e iogurte; e apenas mensalmente o consumo de carne vermelha.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que:

1. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente e o mais comum entre as mulheres, na região sul do país aparece em primeiro lugar. No Brasil a estimativa de novos casos par a 2012 é de 52.680.

2. As reações adversas advindas do tratamento quimioterápico representam para muitas pacientes a perda da qualidade de vida e autoestima e muitas vezes o abandono do tratamento proposto.

3. A nutrição exerce papel fundamental na manutenção e recuperação da saúde bem como na prevenção de doenças, incluindo o câncer.

4. As interações entre agentes oxidantes, antineoplásicos e os diversos componentes da dieta podem oferecer efeitos benéficos para os pacientes oncológicos, que inclui alívio dos efeitos adversos do tratamento, melhora da resposta imunológica, melhora da composição corporal e da qualidade de vida.

5. Ainda são escassos os trabalhos existentes na literatura que apresentem resultados da associação da terapia nutricional utilizando β -glucana aplicada em pacientes com câncer de mama.

6. Apesar de postulados os modos de ação antimutagênico por meio dos quais a β -glucana atue, até o presente momento não foram encontradas, na literatura, informações sobre quais mecanismos moleculares esse polissacarídeo possa exercer uma atividade quimiopreventiva.

Mediante essas informações espera-se compreender os possíveis efeitos protetores da β -glucana em relação ao carcinoma mamário, bem como avaliar se a suplementação em mulheres com câncer de mama pode contribuir para reduzir os efeitos mutagênicos e o estresse oxidativo provocados pelos quimioterápicos, melhorar os parâmetros bioquímicos e hematológicos e verificar sua ação na composição corporal de mulheres com câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antitumoral do polissacarídeo β -glucana (*in vitro*) e os efeitos da suplementação de β -glucana nos parâmetros nutricionais e bioquímicos e nos indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos do polissacarídeo β -glucana sobre a expressão dos genes Ciclina A (CCNA1), CASP9 e SOD1 em células de carcinoma mamário humano (MCF-7) por meio da PCR em tempo real.
2. Avaliar o efeito da suplementação da β -glucana sobre os parâmetros antropométricos e o consumo alimentar de mulheres com câncer de mama.
3. Avaliar o efeito da suplementação de β -glucana sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e os indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.
4. Avaliar a presença dos efeitos colaterais da quimioterapia em mulheres com câncer de mama suplementadas com β -glucana.

4 REFERÊNCIAS

- AKRAMIENĖ, D. et al. Effects of β -glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, v. 43, n. 8, p. 597-66, 2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2009**. Atlanta: American Cancer Society; 2009.
- ANAZETTI, M. C; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.
- ARIIZUMI, K. et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 26, p. 20157-20167, 2000.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativa e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BATTLE, J. et al. Ligand binding to the (1-3)- β -D-glucan receptor stimulates NF κ B activation, but not apoptosis in U937 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 249, n. 2, p. 499-504, 1998.
- BEHALL, K. M. et al. Consumption of both resistant starch and β -glucan improves postprandial -plasma glucose and insulin in women. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 29, n. 5, p. 976-981, 2006.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BLANDER, G. et al. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 38966-9, 2003.
- BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Pin. Cell. Biol.**, v. 15, p. 725-31, 2003.
- BOREK, C. Dietary antioxidants and human cancer. **Integr Cancer Ther**, v. 3, n. 4, p. 333-341, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2006**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2008**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Acesso em: 12 set. 2010.

- BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 3155-62, 2005.
- BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat Rev Immunol.**, v. 6, n. 1, p. 33-43, 2006.
- BROWN, G. D. et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. **J Exp Med**, v. 196, n. 3, p. 407-12, 2002.
- BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 119-1124, 2003.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. A new receptor for β -glucans. **Nature**, London, v. 413, n. 1, p. 36-36, 2001.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 471-479, 2005.
- BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 15, p. 269-90, 1999.
- CHAN, G. C.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **J. Hematol. Onco.**, v. 2, p. 25-58, 2009.
- CHAN, Y et al. Immunomodulatory effects of agaricus blazei murril in balb/cByJ mice. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, p. 201-8, 2008.
- CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycol Res.**, v. 111, p. 635-52, 2007.
- CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutation Res.**, v. 371, p. 115-20, 1996.
- 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. 83-9, 1998.
- CISNEROS, R. L.; GIBSON, 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.
- COLLECCHI, P. et al. Cyclins of phases G1, S and G2/M are overexpressed in aneuploid mammary carcinomas. **Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)**, v. 42, p. 254-60, 2000.
- CONRACT, B. Genetic Control Programmed Cell Death During Animal Development. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 493-523, 2009.
- CZOP, J. K.; AUSTEN, K. F. A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. **J Immunol**, v. 134, p. 2588-93, 1985.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, v. 402, p. 151-8, 1998.

DEMIR, G. et al. β -glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 113-116, 2007.

DI LUZIO, N. R. et al. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucans. **Int. J. Cancer**, v. 24, p. 773-9, 1979.

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.

DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1-21, 2004.

FALCH, B. H. et al. The cytokine stimulating activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Res.**, v. 329, p. 587-96, 2000.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition.**, v. 18, n. 10, 2002.

FENG, Hong et al. β -glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 9023-31, Dec. 2003.

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

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Canc.**, v. 48, p. 375-82, 2002.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FLAGG, E. W.; COATES, R. J.; GREENBERG, R. S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 14, p. 419-27, 1995.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798-811, 2006.

GÖKSEL, S. et al. β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, p. 170-8, 2006.

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.

GONZALEZ, C. A. Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence. **British Journal of Nutrition**, v. 96, suppl. 1, p. 42-6, 2006.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol Signals Recept**, v. 10, p. 147-61, 2001.

GRÜTER, A.; FRIEDERICH, U.; WÜRGLER, F. E. Antimutagenic effects of mushrooms. **Mutation Res.**, v. 231, p. 243-49, 1990.

GUIMARAES, D. P.; HAINAUT, P. TP53: a key gene in human cancer. **Biochimie**, v. 84, p. 83-93, 2002.

HALL, M.; PETERS, G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases and Cdk inhibitors in human cancer. **Adv. Cancer Res.**, v. 68, p. 67-108, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Envir. Molec. Mutagenesis**, v. 15, p. 145-82, 1990.

HENGARTNER, M. O. He biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-76, 2000.

HERRE J, GORDON S, BROWN GD: Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p.869-876, 2004.

HOFER, M.; POSPISIL, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice: a survey of the authors' results. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 607-9, 1997.

HOHENEGGER, M. Muscle and tumor signaling. Disponível em: <https://.../mitarbeiter/ca_muskel_en.htm>. Acesso em: 9 out. 2011.

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. 762-8, 1981.

HONG, F. et al. β - Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 9023–31, Dec., 2003.

HUANG, P. et al. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. **Nature**, v. 407, p. 390-5, 2000.

HYUNSOOK, K. et al. Glucose and insulin responses to whole grain breakfasts varying in soluble fiber, b-glucan. **Eur. J. Nutr.**, p. 1-6, 2009.

HYUNSOOK, K. et al. Glucose and insulin responses to whole grain breakfasts varying in soluble fiber, b-glucan. **Eur. J. Nutr.**, p. 1-6, 2009.

ISHII, P. L. et al. Evaluation of agaricus blazei in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 412-22, 2011.

KAISER, A. B.; KERNODLE, D. Synergism between poly-(1→6)-β-Dglucopyranosyl-(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. 2449-51, 1998.

KANENO, Y.; CHIHARA, G.; TAGUCHI, T. Activity of lentinan against cancer and AIDS. **Int. J. Immunother**, v. 4, p. 203-13, 1989.

KERCKHOFFS, D. A.; HORNSTRA, G.; MENSINK, R. P. Cholesterol-lowering effect of beta-glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when beta-glucan is incorporated into bread and cookies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 221-7, 2003.

KESSIE, F. et al. Chemoprotective effects of garden cress (*Lepidium sativum*) and its constituents towards 2-amino-3-methyl-imidazo [4,5-f] quinoline (IQ)-induced genotoxic effects and colonic preneoplastic lesions. **Cacinogenesis**, v. 23, p. 1155-61, 2002.

KEY, T. J. et al. Diet, nutrition and prevention of cancer. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 187-200, 2004.

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble β-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 3, p. 496-500, 2006.

KIM, M. J. et al. β-Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. **Nutrition Research and Practice**, v. 3, n. 3, p. 180-4, 2009.

KIM, S. Y. et al. Biomedical issues of dietary fiber β-Glucan. **J. Korean Med. Sci.**, v. 21, p. 781-9, 2006.

KIM, Y. W. et al. Ant-diabetic activity of β-glucan and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 483-7, 2005.

KOGAN, G. et al. Increased efficiency of lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator: yeast carboxymethyl glucana. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 2, p. 775-81, 2002.

KUBALA, L. et al. The effect of (1→3)-β-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Res.**, v. 338, p. 2835-40, 2003.

KULICKE, W. M.; LETTAU, A. L.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1-3)-β-D-glucans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 297, n. 2, p. 135-43, 1997.

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

LIN, H. et al. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. **Int. Immunopharmac**, v. 4, p. 91-9, 2004.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. B-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 631-650, jul./set. 2008.

MAKI, K. C. et al. Effects of consuming foods containing oat beta-glucan on blood pressure, carbohydrate metabolism and biomarkers of oxidative stress in men and women with elevated blood pressure. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 786-95, Dec. 2006.

MAKIN, G.; HICKMAN, J. A. Apoptosis and cancer chemotherapy. **Cell tissue Res.**, v. 301, p.143-52, 2000.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9. 153-66, 2009.

MANNERS, D. J. et al. The structure of a $\beta(1-6)$ - D- glucan from yeast cell walls. **Biochemistry Journal, Washington**, v. 135, n. 1, p. 31-6, 1973.

MANNION, C. et al. Components of an anticancer diet: dietary recommendations, restrictions and supplements of the bill henderson protocol. **Nutrients**, v. 3, p. 1-26, 2011.

MANTOVANI, M. S. et al. Beta-glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. **Mutat. Res.**, v. 658, p. 154-61, 2008.

MASIHI, K.N. Immunomodulators in infectious diseases panoply of possibilites. **Int. J. Immunopharmacol**, v. 22, p. 1083-91, 2000.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, p. 345-61, 1995.

MEIRA, D. A. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 496-503, 1996.

MEISTER, K.; MORGAN, J. Risk factors for breast cancer: a report by the. **American Council on Science and Health**, 2000.

MÈULLER-TIDOW, C. et al. Cyclin A1 is highly expressed in aggressive testicular germ cell tumors. **Cancer Lett.**, v. 190, n. 1, p. 89-95, 2003.

MIADOKOVÁ, E. et al. The role of natural biopolymers in genotoxicity of mutagens/carcinogens elimination. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc**, v. 149, p. 493-6, 2005.

MIANA-MENA, F. J. et al. Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclEROSis. **J. Neurol.**, 25 nov. 2010.

MILNER, J. Nutrigenomics and nutrigenetics. In: HEBER, D. et al. **Nutritional Oncology**. 2. ed. Burlington: Elsevier, 2006. p. 15-24.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Prolif.**, v. 33, p. 261-74, 2000.

MOON, S. H. et al. BRD-glucan exhibits potent immunochemotherapeutic activity in vitro and in vivo. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 26, n. 2, p. 395-404, 2005.

MOTOKURA, T.; ARNOLD, A. Cyclins and oncogenesis. **Biochem Biophys Acta**, v. 1155, p. 63-78, 1993.

OLIVEIRA, R. J. et al. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 41-52, 2007.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidants status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 3, p. 999-1007, 1999.

PELÚZIO, M. C. G. et al. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 3, n. 21, p. 233-8, 2006.

PIERCE, J. P. et al. Telephone counseling intervention increases intakes of micronutrient- and phytochemical-rich vegetables, fruit and fiber in breast cancer survivors. **J. Nutr.**, v. 134, p. 452-8, 2004.

PINHO, V. F. S.; COUTINHO, E. S. F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1061-9, 2007.

QUEENAN, K. M. et al. Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RANKIN, A. J. et al. 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. 1556-64, 1990.

REID, D. M. et al. Expression of the β -glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 76, n. 1, p. 86-94, 2004.

REYNOLDS, J. A. et al. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. **Infect Immun.**, v. 30, p. 51-7, 1980.

RIBEIRO, G. F.; CÔRTE-REAL, M.; JONANSSON, B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. **Molecular Biology of the Cell**, v. 7, p. 4584-91, 2006.

ROCK, C. L.; DEMARK-WAHNEFRIED, W. Nutrition and survival after the diagnosis of breast cancer: a review of the evidence. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 15, p. 3302-16, 2002.

RUPNARAIN, C. et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, v. 385, p. 449-64, 2004.

SANDULA, J.; MACHOVÁ, E.; HRIBALOVÁ, V. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana and its water-soluble derivatives. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 323-6, 1995.

SCHOREY, J. S.; LAWRENCE, C. The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria. **Curr. Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 123-9, 2008.

SCHRAUZER, G. N. Anticarcinogenic effects of Selenium. **Cel. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 1864-73, 2000.

SHAHINIAN, S.; BUSSEY, H. β -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, Salem, v. 35, n. 3, p. 477-489, 2000.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.**, v. 60, p. 3689-95, 2000.

SHIOZAKI, E. N; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. **Biochemical Sciences**, v. 39, n. 9, p. 486-94, 2004.

SIES H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-9, 1993.

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.

SLAMENOVÁ, D. et al. Protective effects of fungal (1-3)-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Let.**, v. 198, p. 153-60, 2003.

STEELE, C. et al. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the dectin-1 β -glucan receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 198, n. 11, p. 1677-88, 2003.

SULLIVAN, R.; SMITH, J. E.; ROWAN, N. J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. **Perspect Biol. Med.**, v. 49, p. 159-70, 2006.

SUN, L.; ZHAO, Y. The biological role of dectin-1 in immune response. **International reviews of immunology**, v. 26, n. 5-6, p. 349-64, 2007.

SURH, Y. J. et al. 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. 219-24, 1996.

SYED, H. A. The world of β -glucans: a review of biological roles, applications and potential areas of research. **Institute of Medical Biology**, Norway, May. 2009.

TAKAHASHI, H. et al. Association of immunological disorders in tethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. **Immun. Med. Microb.**, v. 31, p. 1-14, 2001.

TAYLOR, P. R. et al. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3876-82, 2002.

THOMSON, C. A. et al. Diet and biomarkers of oxidative damage in women previously treated for breast cancer. **Nutr. Cancer**, v. 51, p. 146-54, 2005.

TOHAMY, A. A. et al. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. **Mutation Res.**, v. 541, p. 45-53, 2003.

TOKUNAKA, K. et al. Application of Candida solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **Internacional Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 59-67, 2002.

TSUKADA, C. et al. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. **Cellular Immunology**, v. 221, n. 1, p. 1-5, 2003.

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. 285-7, 1996.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VALKO, M. et al. Role oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VETVICKA, V. β -glucans as immunomodulators. **JAMA**, v. 3, p. 31-4, 2001.

WEITBERG, A. B. A phase I/II trial of beta-(1,3)/(1,6) D-glucan in the treatment of patients with advanced malignancies receiving chemotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 40, p. 1-4, 2008.

WILLIAMS, D. L. Overview of (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 247-50, 1997.

WILLMENT, J. A.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Characterization of the human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 47, p. 43818-23, 2001.

XIAO, Z.; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. β -Glucan enhancement of T cell IFN- γ response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 315-20, 2004.

YAMAMOTO, K. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of β -1,3-D-glucan purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. **Biol. Pharm. Bull**, v. 32, p. 259-63, 2009.

YOUNGER Healthier Skin. Disponível em: <<http://esteticacosmetologiasaude.blogspot.com>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

ZEKOVIC, D. B. Natural modified (1-3)- β -glucans in health promotion and disease alleviation. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 25, n. 4, p. 205-30, 2005.

ZHANG, M. et al. Growth-inhibitory effects of a β -glucan from the mycelium of *Poria cocos* on human breast carcinoma MCF-7 cells: cell-cycle arrest and apoptosis induction. **ONCOLOGY REPORTS**, v.15, p.637-643, 2006.

ZHANG, S. et al. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, p.547-56, 1999.

ZIMMERMAN, J. W. et al. 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. 22014-20, 1998.

ZORNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 551, p. 1-37, 2001.

5 ARTIGO 1

EFEITOS DA β -GLUCANA EXTRAÍDA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CASP9, CCNA1 E SOD1 EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MCF-7)¹

Resumo: β -glucana (β G) são polissacarídeos estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose. Uma importante fonte é a *Saccharomyces cerevisiae*. A β G é considerada um modificador da resposta biológica em razão de suas propriedades imunomoduladora, anticarcinogênica e antimutagênica capaz de prevenir danos ao DNA. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da β G sobre a expressão dos genes CCNA1, CASP9 e SOD1 em células MCF-7, por meio do ensaio da RT-PCR em tempo real. A citotoxicidade da β G e da doxorubicina (DOX) foi avaliada pelo ensaio do MTT. Três diferentes concentrações de β G (25, 50 e 100 μ g/mL) e três diferentes concentrações de DOX (0,1; 2,5 e 5 μ g/mL) foram testadas. Nenhuma das concentrações de β G apresentou citotoxicidade, enquanto que todas as concentrações da DOX apresentaram citotoxicidade. Para a análise de RT-PCR foram utilizadas as concentrações de 50 μ g/mL para β G e de 0,1 μ g/mL para DOX. O protocolo experimental foi com quatro tratamentos: controle, MCF-7 tratadas com β G (T1), com DOX (T2) e associação dos compostos β G + DOX (T3), por período de 12hrs. A análise transcricional dos genes CCNA1 e CASP9 indicou aumento significativo de 4,0 e 5,2x respectivamente, para as células expostas a β G. No entanto, a análise dos mesmos transcritos gênicos em células tratadas com DOX apresentou redução significativa apenas na expressão de CCNA1 de 4,7x. A associação apresentou aumento significativo na expressão de CCNA1 e SOD1 de 10,4 e 5,2x respectivamente. Os resultados demonstraram que células MCF-7 expostas a β G tiveram a expressão do gene CASP9 aumentada, favorecendo a apoptose, mas não foi capaz de parar o ciclo celular. A exposição simultânea destas células (T3) aumentou a expressão de ciclina A1 e de SOD1, indicando que essa associação pode ser responsável pelo aumento das defesas intracelulares antioxidantes e assim contribuir para inibição da proliferação de MCF-7, bem como induzir o reparo na lesão do DNA provocado pelo quimioterápico.

Palavras-chave: β -glucana. Doxorubicina. Expressão gênica. CASP9. CCNA. SOD. MCF-7.

INTRODUÇÃO

A β -glucana (β G) é um polissacarídeo presente na parede celular de plantas e leveduras que tem despertado interesse de pesquisadores por sua ação moduladora no sistema imune e nas defesas antioxidantes intracelulares atuando, principalmente, na

¹ Artigo científico escrito pelos autores: Clisia Mara Carreira (Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina); Sandra Lepri (Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina); Daniele Sartori (Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina); Ariane Fernanda Silva (Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina), Marciane Magnoni (Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - João Pessoa); Mário Sérgio Mantovani (Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina).

prevenção de câncer. Recentes pesquisas têm demonstrado que as glucanas podem prevenir danos ao DNA induzidos por agentes químicos e físicos aos quais os seres humanos estão expostos. As principais fontes alimentares são a cevada, a aveia e cogumelos como o *mitake* e o *shiitake* e de *sacaromices serevisiae* (ZEKOVIC et al., 2005).

Além das propriedades anteriormente descritas, as β -glucanas despertam o interesse de pesquisadores na área de genética e câncer, especialmente na subárea de mutagênese e anticarcinogênese. Estudos recentes tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstram sua eficácia significativa na prevenção de efeitos mutagênicos causados por agentes tais como o peróxido de hidrogênio, doxorrubicina e ciclofosfamida (CHORVATOVICOVÁ; MACHOVÁ; SANDULA, 1996, 1998; TOHAMY et al., 2003; KRIZKOVA et al., 2003; SLAMENOVA et al., 2003; LIN et al., 2004).

Em um ensaio clínico prospectivo de curto prazo, efeitos imunológicos da administração oral diária de glucana (β -1,3; β -1,6) foram avaliados em 23 pacientes com câncer de mama avançado e comparadas com 16 mulheres saudáveis. Amostras de sangue foram recolhidas no dia 0 e 15. Verificou-se que, apesar de uma contagem de células brancas inicial relativamente baixa, administração oral de β -glucana pode estimular a proliferação e ativação de monócitos do sangue periférico em pacientes com câncer de mama avançado. Se isso pode ser traduzido em benefício clínico permanece sem resposta (CHAN; CHAN; SZE, 2009).

A β -glucana ainda parece ser uma forte candidata a auxiliar na prevenção de danos ao DNA, sejam eles basais e/ou induzidos por tratamentos, como é o caso da quimioterapia. Recente estudo realizado por Magnani et al., (2011), 20 pacientes portadores de câncer de próstata receberam cápsulas contendo 20mg de β -glucana derivada de *S. cerevisiae* por 28 dias. Amostra de sangue periférico foi coletada para análise dos leucócitos e para o teste do cometa. Os resultados foram positivos, indicando que a β -glucana pode ser eficiente protetora contra danos ao DNA causados por compostos mutagênicos por meio da atividade desmutagênica, seja por sua capacidade de bloquear a ação de agentes indutores de dano ou por sua atividade bio-antimutagênica, que exerce seu efeito protetor de danos, ou ainda promovendo o reparo do DNA, uma vez que Oliveira et al. (2007) mostraram que esta é uma característica da β - (1-3) (1-6) -D-glucana de *S. Cerevisiae*.

No entanto, apesar de postulados quais os modos de ação antimutagênico por meio dos quais a β -glucana atua, não foram encontradas na literatura informações sobre quais mecanismos moleculares estão envolvidos para que este polissacarídeo exerça sua atividade quimiopreventiva. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da

β G sobre a expressão dos genes CASP9, CCNA e SOD1 em culturas de células MCF-7 tratadas com Doxorubicina (DOX).

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem Celular de Câncer de Mama (MCF-7) e protocolo experimental

Células MCF-7 (linhagem celular dependente de estrogênio) foram obtidas a partir do banco de células do Rio de Janeiro, Brasil (RJCB). As células foram cultivadas em 5,0 mL de meio de cultura DMEM/F12 (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal – SBF (Gibco). O cultivo celular se deu em estufa do tipo BOD a 37°C, sistema de monocamada, frasco de 25cm² em concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ células. Nestas condições, o tempo de ciclo celular é de aproximadamente 12 e 24 horas. Após 24 horas, as células foram tripsinizadas com tripsina a 0,5. Para a indução de danos no DNA, utilizou-se o agente doxorubicina (DOX) que foi preparado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e adicionado à cultura. Foram testadas diferentes concentrações de DOX: 0,1; 2,5 e 5 μ g / mL; DOX 0,1, DOX 2,5 e DOX 5,0 respectivamente determinada por ensaios de citotoxicidade do MTT.

Os polissacarídeos de β -glucana, testados neste estudo, foram extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* e cedidos pelo Dr. Hevenilton José Matiazi, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos do Centro de Ciências dos Alimentos da Universidade Estadual de Londrina – PR.

A extração das β -glucanas com cadeias principais contendo ligações β -(1 \rightarrow 3) e ramificações laterais com ligações β -(1 \rightarrow 6) foi realizada 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 (10%), lavada e centrifugada três vezes e secada em estufa a 40°C. Foi realizada análise em RMN (cromatografia por ressonância magnética nuclear), comprovando a presença de (1,3 e 1,6) β -D-glucan com pureza de 85% e em seguida fez-se a solubilização da glucana, utilizando DMSO (dimetil sulfóxido) mais uréia 8M, na proporção de 100mL:60g. Acrescentou-se em banho-maria 100mL de DMSO com 10mL de ácido sulfúrico concentrado, permanecendo em agitação por 4 horas a 100°C. Fez-se então a diálise com aproximadamente 100L de água

ultra-pura (Milli-Q). Concentrou-se a solução em um evaporador rotativo a 40°C para a posterior liofilização (MATIAZI, 2005).

Diferentes concentrações de β -glucana foram testadas: 25, 50 e 100 μ g/mL; (β 25, β 50, β 10), respectivamente, determinadas pelo ensaio de citotoxicidade do MTT. A β -glucana foi preparada em solução de PBS (Phosphate-buffered Saline), livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7.4 e foi dissolvida em DMSO. Para a indução de danos no DNA, utilizou-se o agente alquilante, Doxorrubicina (DOX) diluído em solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{2+} e Mg^{+2} , pH 7,4, estéril. Diferentes concentrações foram testadas pelo ensaio de citotoxicidade do MTT: 0,1, 2,5, 5,0 μ g/mL.

Análise de Citotoxicidade (MTT)

O efeito citotóxico da β -glucana e da Doxorrubicina em linhagem celular humana MCF-7 foi determinada pelo ensaio do Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) baseado no protocolo descrito por Mossmann, (1983). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2.5×10^4 células/poço em 100 μ L meio DMEM (Gibco), e pré-incubada em 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após o tempo estimado, a solução sobrenadante foi removida e substituída por um meio fresco sem Soro Bovino Fetal (SBV), contendo β G na concentração de (25, 50 e 100 μ g/mL) e DOX na concentração (0,1; 2,5; e 5 μ g/mL) e um frasco contendo células MCF-7 sem tratamento foi usado como controle, por 24 horas. Após 4h, 150 μ l de cultura com meio mais o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço. A solução de MTT foi cuidadosamente descartada e formazan foi extraído das células com 200 μ l of DMSO em cada poço. A coloração dos 96 poços foi medida pelo leitor de ELISA a 550 nm. Os dados foram avaliados como taxa de sobrevivência celular relativa (%) = (Teste de Absorbância/Absorbância controle) $\times 100\%$. Este ensaio foi realizado em triplicatas. Após a análise estatística a concentração final escolhida para os experimentos de PCR-RT foi 0,1 μ g/mL para Dox e 50 μ g/mL para β G.

Análise Quantitativa Real-time (PCR-RT)

A cultura de células MCF-7 (1.0×10^6 /frasco) foi pré-incubada por 24 horas e tratada por 12 horas sendo assim distribuído: 1- células MCF-7 sem tratamento (controle), 2-

células MCF-7 tratadas com DOX, 3- células MCF-7 tratadas com β G e 4- células MCF-7 tratadas com DOX e β G. O RNA total foi extraído usando o reagente TRIZOL® (Invitrogen) segundo protocolo do fabricante. As amostras de RNA foram incubadas com DNase (1U) (CAS 18068-015, Invitrogen) a 37° por 15 minutos e foram inativados a 65° por 5 min. A quantidade e a pureza do RNA preparado de cada amostra foram determinados por espectrofotometria (BioPhotometer - Eppendorf) e a integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. RNA Total (2 μ g), 10pmol/ μ L oligo dT primer (1 μ L, 10 mM dNTPs (2 μ L), RNaseOUT (0,1 μ L and reverse Transcriptase M-MLV (Invitrogen) foram usados para sintetizar o cDNA.

A RT-PCR tempo real foi realizada usando o Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). O volume total para cada primer testado com os diferentes cDNAs foi de 20 μ l em cada microtubo. As reações foram desenvolvidas em PTC 200 DNA Engine Cycler usando o sistema de Detecção Chromo 4 (MJ Research). A análise da curva de *melting* foi consistentemente realizada no final da reação com a temperatura entre 50 to 90°C. Os dados foram normalizados usando o GAPDH gene constitutivo (WEGLARZ, 2006), considerando uma eficiência dos genes maior que 80%, em cada cDNAs amplificado nos experimentos de PCR-RT . A expressão relativa dos dados foi obtida usando o método PFAFFL (2002). Os oligonucleotídeos usados foram: SOD-1 (*Homo sapiens superoxide dismutase 1*), Ciclina A1 (*Homo sapiens cyclin A1* (CCNA1), Capase 9 (*apoptosis-related cysteine peptidase* (CASP9) e GAPDH (*Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers usados para Amplificação por PCR-RT

Acesso gene bank	Genes	Sequencia	TM	Referências
NM_003914	CCNA1	Forward: 5'AGACCCTGCATTTGGCTGTG3' Reverse: 5'ACAAACTCTGCTACTTCTGG3'	58	Food and Chemical Toxicology 44 (2006) 974-983
BC_001034	CASP9	Forward: 5'GCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC3' Reverse: 5'GTTTTCTAGGGTTGGCTTCG3'	58	_____
BC_001034	SOD1	Forward: 5'CTAGCGACTTATGGCGAC3' Reverse: 5'GAATGTTTATTGGGCGATC3	56	Wei-Qun Ding, et al., 2004
NM_002046	GAPDH	Forward: 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC3' Reverse: 5'AAATCCCATCACCATCTTCC3'	58	Weglarz, 2006

Legenda: Sense and antisense primers used for the amplification of CCNA1, CASP9, SOD1, and GAPDH cDNA.

Análise Estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata com dois experimentos independentes. Os dados são expressos como valores médios \pm desvio padrão (SD). Para o ensaio MTT, o teste ANOVA / TUKEY foi usado e a significância estatística assumida foi de $p < 0,05$. Para a RT-PCR, foi utilizado o software REST (Relative Expression Software Tool-384, REST-384 © versão-2 (PFAFFL et al., 2002) para análise estatística. Para a indução de expressão de mRNA ou redução, apenas os níveis acima de duas vezes com diferenças estatisticamente significativas foram vistos como relevantes.

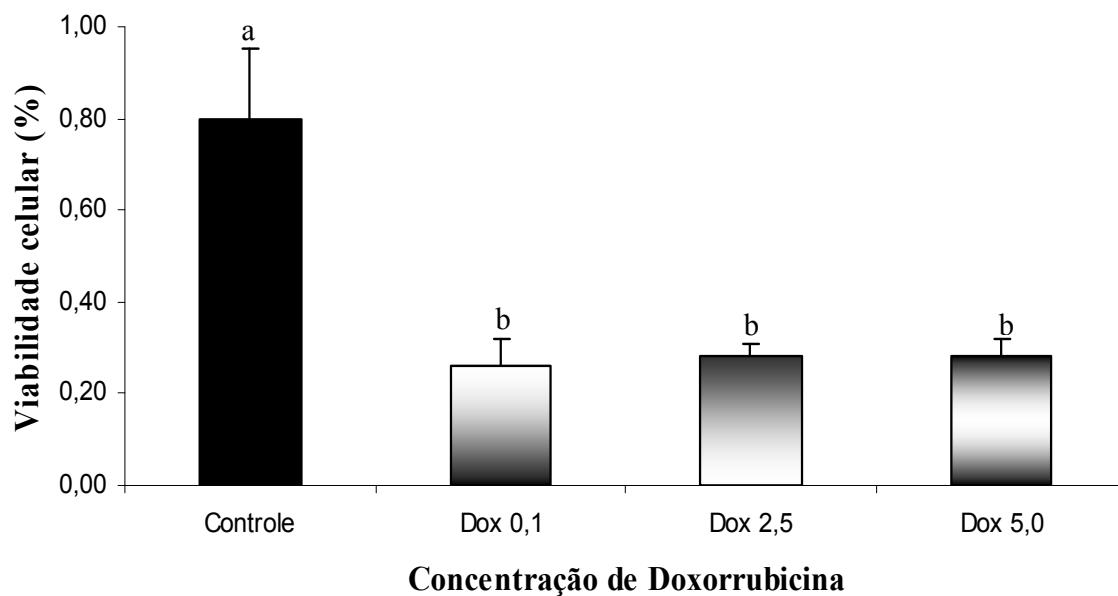
RESULTADOS

Ensaio de citotoxicidade (MTT)

A avaliação da viabilidade celular da linhagem MCF-7 pelo ensaio do MTT indicou que todas as concentrações de Doxorrubicina (DOX) testadas são citotóxicas e não houve uma correlação dose resposta. A análise ainda permitiu relatar que não há diferenças estatisticamente significativas na atividade citotóxica das diferentes concentrações avaliadas (Figura 1). A avaliação da β -glucana, pelo mesmo ensaio biológico, demonstrou que este

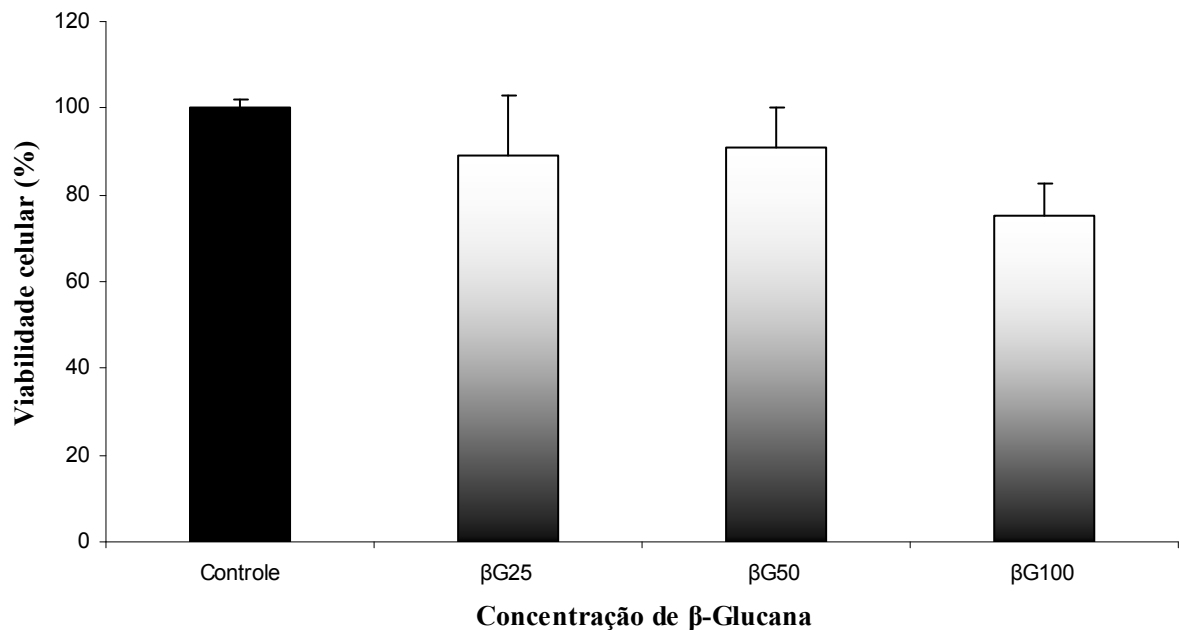
polissacarídeo não é citotóxico em nenhuma das concentrações avaliadas segundo o protocolo proposto (Figura 2).

Figura 1 - Valores médios \pm desvio padrão da viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT após 24h de tratamento das células MCF-7 com DOX.



Legenda: Controle (PBS); DOX 0,1 – concentração final de 0,1 μ g/mL; DOX 2,5 – concentração final de 2,5 μ g/mL e DOX 5,0 – concentração final de 5 μ g/mL. $p < 0,001$).

Figura 2 - Valores médios \pm desvio padrão da viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT após 24h de tratamento das células MCF-7 com β -glucana.



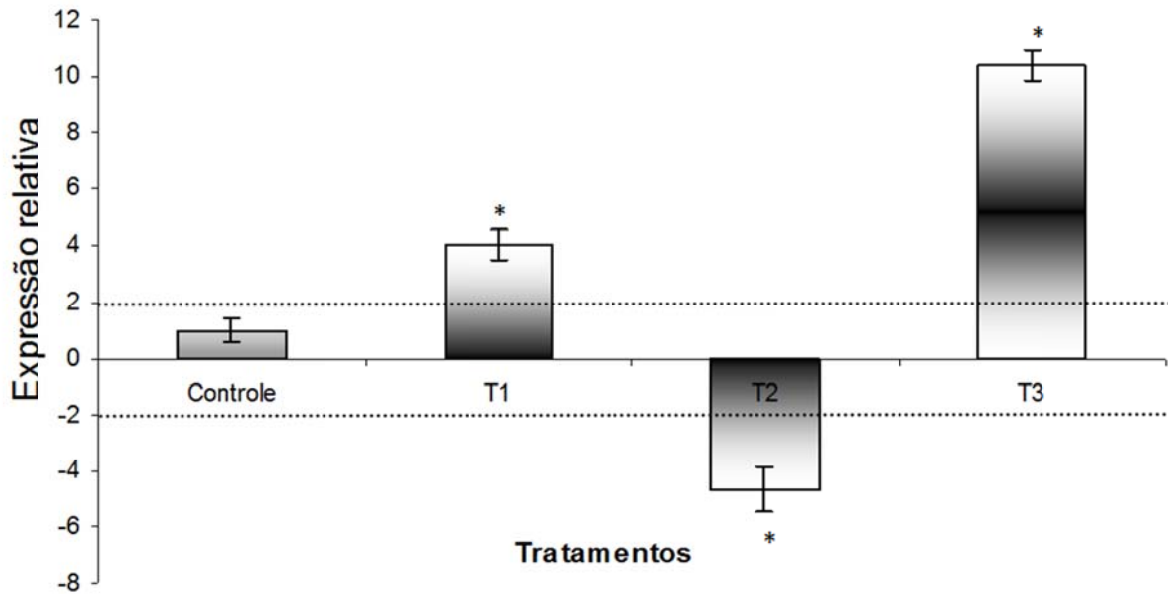
Legenda: Controle; β G25 – concentração final de 25 μ g/mL; β G50 – concentração final de 50 μ g/mL; β G 100 – concentração final de 100 μ g/mL. $p > 0,05$.

Frente a esses resultados optou-se pelas concentrações de 0,1 μ g/mL de doxorrubicina e de 50 μ g/mL de β -glucana para as análises em PCR por Tempo Real. Uma vez que a menor concentração de doxorrubicina foi capaz de levar a citotoxicidade, enquanto que a β -glucana na concentração de 50 μ g/mL, apresentou atividade quimiopreventiva significativa quando utilizada em outros estudos *in vitro* desse mesmo grupo de pesquisa (dados não mostrados). Esse fato, aliado à ausência de citotoxicidade no ensaio do MTT, validaram a escolha da concentração de 50 μ g/mL de β -glucana para os testes de expressão gênica.

Expressão Gênica

Na Figura 3 estão apresentados os dados de expressão do gene *CCNA1*, em relação ao gene normalizador *GAPDH*. A análise indicou que o tratamento com β -glucana determinou aumento da expressão da ordem de 4,0x. O tratamento da doxorrubicina causou diminuição da expressão da ordem de 4,7x. E a associação desses dois compostos determinou um aumento da expressão gênica da ordem de 10,4x. Sendo que para esse gene todas as expressões foram consideradas significativas.

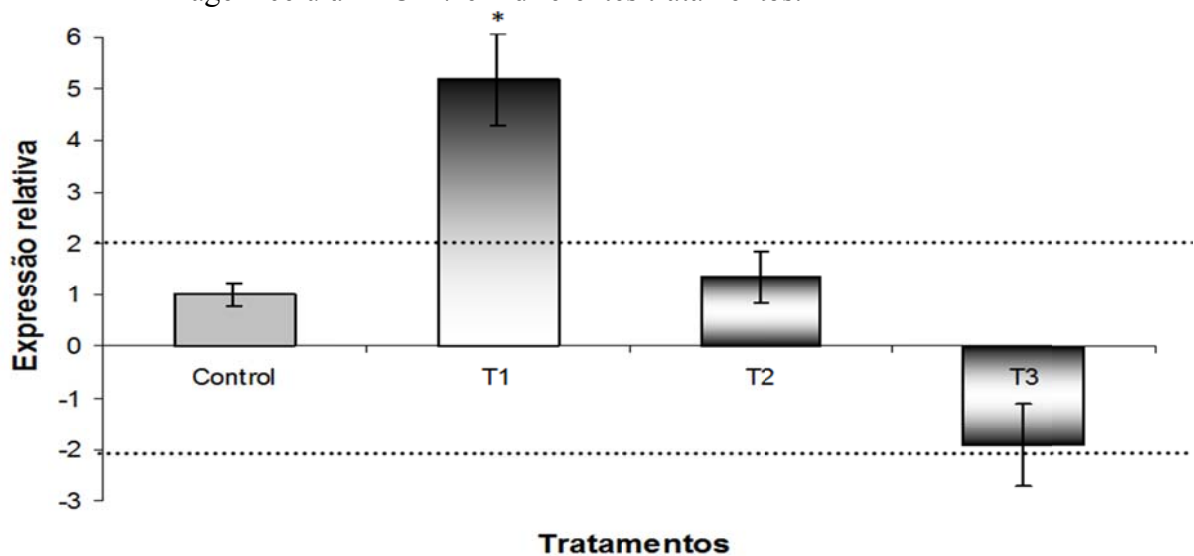
Figura 3 - Expressão relativa do gene *CCNA1*, em relação ao gene normalizador *GAPDH*, na linhagem celular MCF-7 em diferentes tratamentos.



Legenda: Controle; T1 – tratamento com β G50; T2 – tratamento com DOX 0,1; T3 – tratamento associado (β G50 + DOX 0,1). *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $p < 0,05$.

Em relação ao gene *CASP9* verificou-se que a β -glucana determinou aumento da expressão da ordem de 5,2x e a Doxorubicina de 1,3x. Entretanto a associação entre os dois compostos indicou a diminuição da expressão gênica de 1,9x (Figura 4). Os resultados permitiram indicar que as variações na expressão só foram significativas para o tratamento com β -glucana (T1).

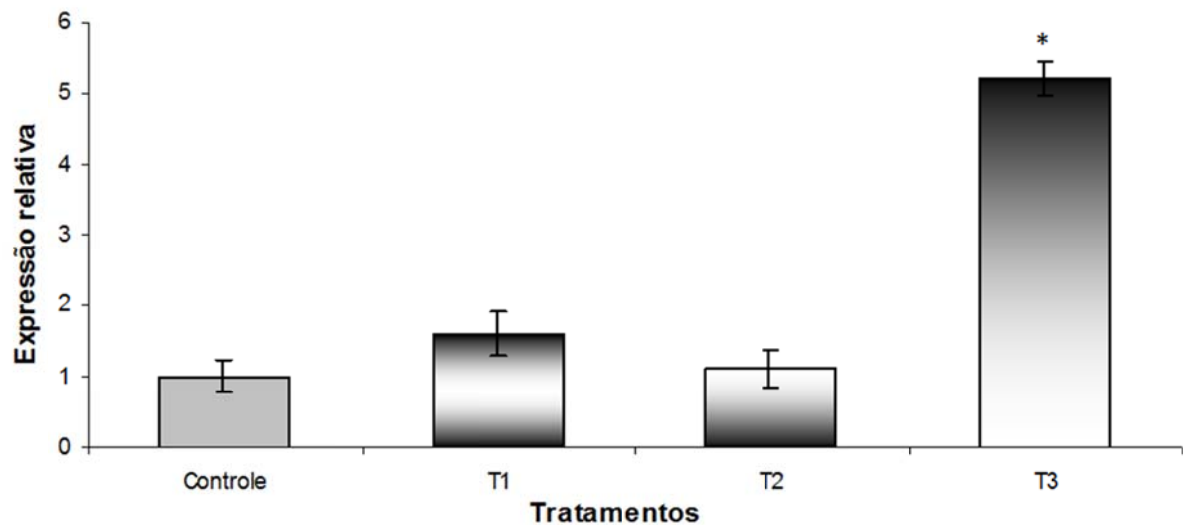
Figura 4 - Expressão relativa do gene *CASP9*, em relação ao gene normalizador *GAPDH*, na linhagem celular MCF-7 em diferentes tratamentos.



Legenda: Controle; T1 – tratamento com β G50; T2 – tratamento com DOX 0,1; T3 – tratamento associado (β G50 + DOX 0,1). *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $p < 0,05$.

Para o gene *SOD1* houve aumento na expressão da ordem de 1,6x e 1,1x e redução de 5,2x para os tratamentos com β -glucana, Doxorubicina e associação, respectivamente (Figura 5). Frente a esses dados observou-se que somente para tratamento associado (T3) a expressão diferencial foi considerada significativa.

Figura 5 - Expressão relativa do gene *SOD1*, em relação ao gene normalizador *GAPDH*, na linhagem celular MCF-7 em diferentes tratamentos.



Legenda: Controle; T1 – tratamento com β G50; T2 – tratamento com DOX 0,1; T3 – tratamento associado (β G50 + DOX 0,1). *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Atualmente a pesquisa por substâncias naturais que possam reduzir a frequência de alterações no DNA tem mostrado ser promissora e com importantes implicações na prática terapêutica devido à possibilidade da redução da taxa de mutações e consequente redução na incidência de câncer. Uma das substâncias que tem despertado o interesse de pesquisadores na área de genética, especialmente na subárea de antimutagênese e anticarcinogênese é a β -glucana (FALCH et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; KUBALA et al., 2003).

Segundo alguns pesquisadores preparações de β -glucana, extraídas de diferentes cogumelos (*Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis*, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Mitake* e *Shiitake*) e de fungos (*Saccharomyces cerevisiae*), foram capazes de promover redução significativa no crescimento de diferentes carcinomas, principalmente de mama, próstata e melanomas B16 (DI LUZIO et al., 1979; ZHANG et al., 2006; NOVAES et al., 2011). Outros estudos realizados com β -glucana, tanto *in vivo* quanto

in vitro, demonstraram eficácia significativa na prevenção de efeitos mutagênicos causados por agentes tais como o peróxido de hidrogênio (SLAMENOVÁ et al., 2003), doxorubicina (LIN et al., 2004) e ciclofosfamida (CHORVATOVICOVÁ; MACHOVÁ; SANDULA, 1996, 1998, TOHAMY et al., 2003).

As β -glucanas fúngicas são polissacarídeos compostos constituídos 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 (DI LUZIO et al., 1979, SANDULA; MACHOVÁ; HRIBALOVÁ, 1995).

Os estudos de CHORVATOVICOVA e colaboradores (1998), HONG, HANSEN e YAN (2003), PELIZON e colaboradores (2005), ANGELI e colaboradores (2006), ZHANG e colaboradores (2006), WEGIEL e colaboradores (2008), CHAN e colaboradores (2009), HYUNG e colaboradores (2011), utilizando linhagens celulares tumorais, sugerem que a β -glucana apresenta ação antitumoral por atuar na inibição do ciclo celular, indução da apoptose e possível neutralizadora de radicais livres. Em vista disso, foi analisado a expressão gênica das enzimas ciclina A, caspase 9 e sod 1 em células MCF-7 tratadas com doxorubicina, β -glucana e a associação das duas substâncias.

Diferentes concentrações de β -glucana e de doxorubicina foram testadas por meio do teste de citotoxicidade (MTT). Os resultados mostram que nenhuma das concentrações de β -glucana apresentou efeito citotóxico após 24 horas de tratamento e todas as concentrações de doxorubicina testadas foram citotóxicas, mas não houve uma correlação dose resposta. Esses dados estão de acordo com os trabalhos de Angeli e colaboradores (2006) e Oliveira e colaboradores (2007) que testaram altas concentrações da β -glucana com ligações β (1-3)(1-6) e não encontraram efeitos tóxicos.

A doxorubicina foi utilizada no presente trabalho como o agente indutor de danos ao DNA. Essa substância é um antibiótico que pertence à classe das antraciclinas utilizada há mais de 40 anos, no tratamento de tumores sólidos, como câncer de mama e ovário e também nas leucemias (MINOTTI et al., 2004; BERTHIAUME; WALLACE, 2007).

Os mecanismos de ação citostáticos pelos quais a DOX atua ainda não estão totalmente esclarecidos para alguns autores a principal ação desse quimioterápico é ligar-se as proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA interferindo na atividade da enzima topoisomerase II α , impedindo a religação do DNA clivado e o enovelamento correto, promovendo quebras irreparáveis na dupla fita do DNA (SILBER et al., 1987; FORNARI et al., 1994; MINOTTI et al., 2004; BOX, 2007; WANG et al., 2009). Outros possíveis

mecanismos de ação dessa substância é a redução das enzimas antioxidantes endógenas, por gerar radicais superóxido e outras espécies de EROs, tais como o radical hidroxil peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil com elevado potencial oxidante (BERLIN; HASELTINE, 1981; BEILLEROT et al., 2008). Entretanto alguns autores discutem que a DOX não parece induzir apoptose em células de câncer de mama *in vitro*, mas induz parada do crescimento celular, acompanhada de morte não apoptótica por danos ao DNA (JACKSON; PEREIRA, 2006; BAR-ON; SHAPIRA; HERSHKO, 2007; SANKALA et al., 2007).

Alguns estudos têm demonstrado associação entre a regulação do ciclo celular e o câncer. Análises moleculares têm indicado que as funções das ciclinas reguladoras do ciclo celular estão frequentemente mutadas em muitos tumores humanos de forma que a perda dos mecanismos responsáveis pelo controle ordenado da progressão das células por meio do ciclo celular e replicação fiel do DNA é um evento inicial e fundamental na progressão do câncer (ZHANG et al., 2006; WEGIEL et al., 2008).

As ciclinas são proteínas reguladoras das quinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*), as quais formam os mecanismos responsáveis pela progressão do ciclo celular (VAN DER VIJVER et al., 2002). A expressão desregulada das ciclinas na oncogênese tem sido sugerida por várias linhas de evidências (KEYOMARSI; PARDEE, 1993; MOTOKURA, 1993; ROSENBERG et al., 1996; COLLECCHI et al., 2000; MÈULLER-TIDOW et al., 2003; MÈULLER-TIDOW et al., 2004; LIAO et al., 2004; RIVERA et al., 2006), representando um evento comum pelo qual as células tumorais não são detidas no ponto de verificação permitindo assim uma alta taxa de proliferação do DNA humano em diferentes tipos de carcinomas.

No presente estudo os resultados mostraram que os tratamentos utilizando β G50 (T1) ou associada a DOX (T3) aumentaram significativamente a expressão do gene CCNA1, enquanto que as células expostas apenas a DOX (T2) diminuiu significativamente a expressão da ciclina. (Figura 3). Esses dados permitem inferir que a expressão do gene CCNA1 foi alterada diferentemente pela ação dos compostos testados em células MCF-7, promovendo aumento da expressão ou redução da expressão da ciclina A1 quando as células foram tratadas com β -glucana isolada ou associada ao agente indutor de danos, ou com a DOX respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Muller-Tidow et al. (2004) que determinou níveis de expressão de ciclina A1 em células de carcinoma de duodeno (HuTu8) e células de carcinoma de cólon (LoVo), após à exposição à irradiação gama e UV. Os autores sugerem que o aumento da expressão da ciclina A1 e CDK2 foi provocado pela

lesão da dupla hélice do DNA, de forma que os resultados permitem concluir a importante participação do complexo ciclina A1-CDK2 no reparo da lesão da dupla hélice do DNA, via p53 e esse reparo pode variar em diferentes momentos após o dano genotóxico. Nesse sentido é provável que a β -glucana associada à DOX potencializou a atividade da CCNA1 na presença de dano ao DNA provocado pelo agente indutor, no entanto essas vias de sinalização em células MCF-7 necessitam ser mais investigadas.

Estudo realizado recentemente avaliou um suplemento dietético MycoPhyto® Complex (MC), contendo uma mistura de micélio de cogumelos medicinais das espécies: *Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis*, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* e *Polyporus umbellatus* e β -glucana isolada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados revelaram que o MC demonstrou efeitos citostáticos por meio da inibição da proliferação celular e parada do ciclo celular na fase G2 / M de células de câncer de mama humanas altamente invasivas (MDA-MB-231), sugerindo que o MC atuou na inibição da expressão de alguns genes reguladores do ciclo celular (ANAPC2, ANAPC2, BIRC5, ciclina B1, ciclina H, CDC20, CDK2, CKS1B, Cullin 1, E2F1, KPNA2, PKMYT1 e TFDP1). Em conclusão, os pesquisadores acreditam que o MC é um suplemento dietético capaz de suprimir a proliferação e o comportamento invasivo das células de câncer de mama (JIANG; SLIVA, 2010).

Frente ao exposto, nossos resultados mostraram que a concentração de 50 μ g/mL de β -glucana isolada de *S. cerevisiae*, não foi suficiente para inibir o ciclo celular de MCF-7. Entretanto novos estudos com diferentes concentrações e com outras linhagens tumorais são necessários para que o mecanismo molecular de ação dessa substância possa ser elucidado.

A compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção da patologia. Embora muitos estudos sobre o efeitos antitumorais de β -glucanas têm sido relatados, o mecanismo de ação da β -glucana em células de câncer de mama via caspases ainda não é totalmente compreendido.

Alguns genes estão envolvidos nos mecanismos de apoptose, seja como protetores ou como promotores (BUDIARDJO et al., 1999). A maioria dos estímulos desencadeia a apoptose por meio da ativação das caspases, grupo de enzimas proteolíticas (*cystenil aspartate specific proteases*) sintetizadas como pró-enzimas inativas. Dentre as 14

caspases humanas descritas até o momento, sabe-se que seis caspases (3, 6, 7, 8, 9 e 10) participam da apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

Com base nessas informações estudou-se o efeito apoptótico da β -glucana derivada de *S.cerevisiae* em células MCF-7 via caspase-9. A análise de RT-PCR dos níveis de mRNA da caspase 9 mostrou que a β -glucana (T1) aumentou significativamente a expressão da caspase, enquanto que os tratamentos com DOX (T2) ou β G associada à DOX (T3) não produziram efeitos significativos (figura 4). Esses achados sugerem que a β -glucana pode induzir apoptose das células de câncer de mama ativando a cascata proteolítica. Estudo realizado por Kim et al (2009) também investigou os efeitos apoptóticos da β -glucana derivada de bactéria, em células humanas de câncer de cólon (SNU-C4) por meio da via de ativação de caspase-3. Os resultados demonstraram que a β -glucana induziu a apoptose das células SNU-C4, inibiu a proliferação celular, alterou a morfologia celular e a expressão dos genes de apoptose e aumentou a atividade da caspase-3. Os pesquisadores concluíram que a β -glucana pode ser uma substância natural benéfica para o tratamento do câncer de cólon e quimioprevenção.

Outro estudo realizado por Kobayashi et al. (2005) demonstraram que a β -glucana de *Agaricus blazei Murill* beta-(1-6)-D-glucana é um potente agente anticancerígeno em modelo *in vitro* e *in vivo*. Um dos resultados do trabalho mostrou que a β -glucana acelerou a cascata de apoptose, estimulando a translocação das proteínas pro-apoptóticas, Bax, do citosol para a mitocôndria, com liberação do citocromo c, e subsequente ativação da caspase-9. Em conclusão os pesquisadores relataram que o tratamento com β -glucana pode ser benéfico para pacientes com câncer ou em risco de metástase.

Fang et al. (2006) conduziram uma investigação *in vitro* de frações dos extratos de cogumelos *Shiitake* (*Lentinus edodes*), por meio de ensaios biológicos de apoptose celular e análise do ciclo de duas linhagens de células humanas de carcinoma de mama (MDA-MB-453 e MCF-7). Os autores observaram atividade antiproliferativa em todas as cepas e a apoptose foi induzida em 50% das linhagens de células tumorais via regulação positiva de bax, uma proteína pró-apoptótica.

Outro estudo realizado por Ghoneum; Gollapudi (2006) utilizou oito cepas de fungos para testar a capacidade deles de induzir apoptose em células cancerosas. As cepas utilizadas foram: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. neoformans*, *Y. lipolytica*, *Saccharomyces S. e R. Rubra* cada uma delas foram avaliadas em diferentes estágios de desenvolvimento. Em 4 horas de tratamento das células MCF-7 com as cepas de leveduras, foram observadas características típicas de apoptose nessas células, incluindo inchaço da

célula, fragmentação nuclear, desaparecimento do núcleo, mancha azul de Trypan, indicando morte celular. Os resultados mostraram um aumento significativo na apoptose das células MCF-7 principalmente quando utilizado *S. cerevisiae*. Os dados mostraram que 45% da apoptose de células MCF-7 foram detectados em 4h após cultura de células de câncer com *S. cerevisiae* e quando prolongado o período de cultivo para 24h revelou que a maioria das células cancerosas (mais de 90%) fizeram apoptose ou foram mortas. Portanto a apoptose de células MCF-7 tratadas com diferentes cepas de leveduras foi induzida, reduzindo significativamente a sobrevivência de uma maneira tempo-dependente.

Mediante o exposto, levanta-se a hipótese de que a β -glucana pode ser capaz de sinalizar para apoptose via caspases, esses achados devem ser confirmados com outros experimentos utilizando diferentes genes pró-apoptóticos e outras linhagens celulares.

Em relação à exposição das células MCF-7 ao quimioterápico DOX, nossos resultados corroboram com outro estudo realizado por Ottewell et al (2009) que observaram a ação da DOX e do ácido zoledrônico, e descobriram que essas substâncias sozinhas não apresentaram efeitos sobre a expressão de apoptose relacionada com os genes testados. Análise de proteína revelou pequenos aumentos na expressão de Caspase 8 e pro-apoptóticos BAX em tumores de câncer de mama tratados com doxorubicina, mas estes aumentos não foram suficientes para ativar a caspase 3, que é necessária para indução de apoptose. Outras pesquisas (BAR-ON; SHAPIRA; JACKSON; PEREIRA, 2006; HERSHKO, 2007; SANKALA et al., 2007) também identificaram que a doxorubicina não foi capaz de ativar apoptose via caspases.

Outro aspecto de importância na tentativa de compreender parte do comportamento biológico da β -glucana, segundo alguns autores (OKAMOTO et al., 2004; ANGELI et al., 2006; GÖKSEL et al., 2006), são as pesquisas relacionadas ao estresse oxidativo, devido sua capacidade de sequestrar os radicais livres altamente reativos, especialmente radicais derivados de oxigênio, formados por processos metabólicos endógenos ou produtos químicos exógenos (YANG et al., 2000), atribuindo a esse composto uma possível ação antioxidante.

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir o estresse oxidativo (MAXWELL, 1995; SIES, 1999). A classificação mais utilizada para estas substâncias é a que as divide em dois sistemas: enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo e não enzimático, composto pelas vitaminas e outros compostos naturais tais como flavonóides, licopenos e bilirrubinas (SIES, 1999). Os alimentos que contêm agentes antioxidantes constituem um dos

principais grupos com propriedades funcionais, conhecida também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (FERRARI; TORRES, 2002).

Estresse oxidativo é o termo usado para referir o desequilíbrio entre a formação de EROS e a atividade de defesa do antioxidante. O severo estresse oxidativo pode causar danos e morte celular, mostrando a participação dos radicais livres em várias doenças como câncer, aterosclerose, artrite reumatoide e envelhecimento (ARUOMA, 1999).

O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é fundamental para um sistema biológico manter sua função normal. Defesas antioxidantes são fornecidas por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (CRAPO et al., 1992). Existem várias formas de SOD em células eucarióticas, que diferem em sua ligação de metal, características e distribuição intracelular. Cu/Zn-SOD, também chamada de SOD1, está localizada principalmente no citosol, é composta por 90% do total de SOD celular (CRAPO et al., 1992), e requer Cu e Zn para sua atividade (CRAPO et al., 1992; OKADOMATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001; NOOR; MITTAL; IQBAL, 2002).

Nesse sentido o presente estudo investigou o efeito da β -glucana derivada de *S.cerevisiae* sobre a expressão da SOD1, em células MCF-7. A análise de RT-PCR dos níveis de mRNA da SOD1, mostrou que tanto o tratamento com o quimioterápico DOX (T2) quanto à β -glucana isolada (T1), aumentaram a expressão gênica da SOD1, mas esses resultados não foram significativos. Entretanto quando se fez a associação entre os dois compostos (T3) houve uma superexpressão do gene (Figura 5).

Em relação aos estudos sobre o estresse oxidativo e atividade antioxidante de β -glucana, os resultados são controversos. Alguns estudos têm demonstrado que as glucanas são capazes de induzir uma série de respostas imunes, tais como liberação de citocinas (ENGSTAD et al., 2002; NAKAGAWA et al., 2003), geração de óxido nítrico (NO) e liberação de metabólitos do ácido araquidônico (HASHIMOTO et al., 1997; LJUNGMAN et al., 1998). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que as β -glucanas, por sua atividade antioxidante, é capaz de reduzir a lesão oxidativa induzida pelo quimioterápico metotrexate e restaurar os níveis de GSH significativamente e também exerce efeito protetor na inibição da ativação do fator nuclear KB (NF-KB) e IL-6 (WILLIAMS et al., 1999; GÖKSEL et al., 2006), além de atuar na prevenção de efeitos mutagênicos causados por agentes tais como o peróxido de hidrogênio (SLAMENOVA et al., 2003), doxorubicina (LIN et al., 2004) e ciclofosfamida (CHORVATOVICOVA et al., 1996, 1998; TOHAMY et al., 2003).

Tem sido demonstrado também que os níveis das enzimas antioxidantes estão alterados no câncer (OBERLEY; OBERLEY, 1997; BOSTWICK et al., 2000, DING et

al., 2004). A SOD desempenha um papel fundamental na proteção das células contra dano oxidativo e reguladora da concentração celular de O₂, que é um oxidante altamente reativo e um produto indesejado do metabolismo celular (LI; OBERLEY, 1997). As funções da SOD não são apenas como uma supressora de tumor, mas também como uma mediadora na resistência de sinalização celular para induzir citotoxicidade dos EROS (LI; 2001), pois o aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna (GREEN; KROEMER, 2004).

Nossos resultados sugerem que a β -glucana associada ao agente indutor de danos ao DNA (DOX) aumentou significativamente a expressão da SOD1, sugerindo que a β -glucana pode melhorar as defesas antioxidantes intracelulares, contribuindo para a interceptação dos radicais livres e o retardo na proliferação das células MCF-7. Dessa forma, a β -glucana poderia agir como coadjuvante ao tratamento quimioterápico, contribuindo para diminuição da lesão e aumentando a atividade antioxidante enzimática que normalmente está reduzida na maioria dos tipos de câncer. Parece provável que as β -glucanas, com suas propriedades anticarcinogênica e imunomoduladora (KRIZKOVA et al., 2003; SENER et al., 2005; TOKLU et al., 2006), possa oferecer proteção contra os efeitos secundários da DOX, que é comumente utilizada para o tratamento do câncer de mama, por meio de seus receptores específicos em monócitos, leucócitos e macrófagos (CLEARY et al., 1999; HUNTER; GAULT; BERNER, 2002; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Além de estimular a função do sistema reticuloendotelial e modular a imunidade celular e humoral (HOFER, 1997), agindo sinergicamente com os fatores de crescimento mielóide, melhorando a recuperação hematopoiética e mobilizando as células progenitoras no sangue periférico (PATCHEN et al., 1998).

Entretanto cabe ressaltar que o mecanismo pelo qual a β -glucana pode interagir com o DNA ou com as enzimas envolvidas na replicação e no reparo do mesmo, ainda precisa ser melhor estudado para que se possa discutir sua capacidade bioantimutagênica, além de saber se as β -glucanas de diferentes origens possuem o mesmo mecanismo de ação e eficácia na prevenção de danos ao DNA.

Ainda é prematura a finalização de estudos científicos com respeito ao mecanismo de ação da β -glucana, bem como a sua indicação ou contra-indicação na quimioprevenção. Fazem-se necessários estudos bioquímicos, clínicos e epidemiológicos que demonstrem melhor a ação do polissacarídeo e sua interação com os agentes indutores de

danos ao DNA, a fim de se esclarecer como realmente se efetiva a sua capacidade anticarcinogênica.

Até o momento, existem poucos dados científicos de estudos clínicos sobre o uso de β -glucana purificada em pacientes com câncer. Estudos futuros devem ser dirigidos para obter informações necessárias para a indicação de β -glucana de forma segura e eficaz para pacientes com câncer em tratamento quimioterápico.

REFERÊNCIAS

- ANGELI, J. P. F. et al. Protective effects of β -Glucan extracted from agaricus brasiliensis against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. **Cell Biol Toxicol**, v. 22, p. 285-91, 2006.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, Carlton South, v. 8, n. 1, p. 53-63, 1999.
- BAR-ON, O.; SHAPIRA, M.; HERSHKO, D. D. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 18, p. 1113-21, 2007.
- BEILLEROT, A. et al. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 1102-5, 2008.
- BERLIN, V.; HASELTINE, W. A. Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 4747-56, 1981.
- BERTHIAUME, J. M.; WALLACE, K. B. Adriamycin induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 23, p. 15-25, 2007.
- BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Pin. Cell. Biol**, v. 15, p. 725-31, 2003.
- BOSTWICK, D. G. et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. **Cancer**, v. 89, p. 123-34, 2000.
- BOX, V. G. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nogalamycin. **J. Mol Graph Model**, v. 26, n. 1, p. 14-9, 2007.
- BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-90, 1999.
- CHAN, G. C.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **J. Hematol. Onco**, v. 2, p. 25-58, 2009.

- CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutation Res.**, v. 371, p. 115-20, 1996.
- 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. 83-9; 1998.
- CLEARY, J. A.; KELLY, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. **Immunol. Cell Biol.**, v. 77, p. 395-403, 1999.
- COLLECCHI, P. et al. Cyclins of phases G1, S and G2/M are overexpressed in aneuploid mammary carcinomas. **Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)**, v. 42, p. 254-260, 2000.
- CRAPO, J. D. et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 89, p. 10405-9, 1992.
- DI LUZIO, N. R. et al. Compartive tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucana. **Int. J. Cancer**, v. 24, p. 773-9, 1979.
- DING, W. Q. et al. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. **Mol. Cancer Ther.**, v. 3, n. 9, Sep. 2004.
- ENGSTAD, C. S. et al. The effect of soluble β -1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. **Int. Immunopharmacol**, v. 2, p. 1585-97, 2002.
- FALCH, B. H. et al. The cytokine stimulating activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Res.**, v. 329, p. 587-96, 2000.
- FANG, N. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by an ethyl acetate fraction from shiitake mushrooms. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 12, p. 125-32, 2006.
- FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Canc.**, v. 48, p. 375-82, 2002.
- FORNARI, F. A. et al. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 45, p. 649-56, 1994.
- GHONEUM, M.; GOLLAPUDI, S. Apoptosis of breast cancer MCF-7 cells *in vitro* is induced specifically by yeast and not by fungal mycelia. **Anticancer Research**, v. 26, p. 2013-22, 2006.
- GÖKSEL, Ş. et al. β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, p. 170-8, 2006.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-9, 2004.

HASHIMOTO, T. et al. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by β -glucans in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 9, p. 131-5, 1997.

HOFER, M. P. M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice: a survey of the authors' results **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 607-9, 1997.

HONG, F. et al. Killer cells immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as β -glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody. **Cancer Res.**, v. 63, p. 9023-31, Dec. 2003.

HUNTER, K. W. J. R.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 267-71, 2002.

HYUNG, S. K. et al. Stimulatory effect of β -glucans on immune cells. **Immune Network**, v. 11, n. 4, Aug. 2011.

JACKSON, J. G.; PEREIRA-SMITH, O. M. Primary and compensatory roles for RB family members at cell cycle gene promoters that are deacetylated and downregulated in doxorubicin-induced senescence of breast cancer cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, p. 2501-10, 2006.

JIAHUA, J.; SLIVA, D. Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 37, p. 1529-36, 2010.

KEYOMARSI, K.; PARDEE, A. B. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 1112-6, Feb. 1993.

KIM, M. J. et al. β -Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. **Nutrition Research and Practice**, v. 3, n. 3, p. 180-4, 2009.

KOBAYASHI, H. et al. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *agaricus blazei murill* on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 131, p. 527-38, 2005.

KRIZKOVA, L. et al. Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 2751-6, 2003.

KUBALA, L. et al. The effect of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Res.**, v. 338, p. 2835-40, 2003.

LI, J. J. Genes regulated in human breast cancer cells overexpressing manganese-containing superoxide dismutase. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 3, p. 260-7, 2001.

LI, J. J.; OBERLEY, L. W. Overexpression of manganesecontaining superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia. **Cancer Res.**, v. 57, n. 10, p. 1991-8, 1997.

LIAO, C. et al. Elevated levels and distinct patterns of expression of A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in male germ cell tumors. **Int. J. Cancer.**, v. 108, n. 5, p. 654-64, 2004.

LIN, H. et al. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. **Int. Immunopharmac.**, v. 4, p. 91-9, 2004.

LJUNGMAN, A. G.; LEANDERSON, P.; TAGESSON, C. (1-3)- β -D-glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 5, p. 273-81, 1998.

MAGNANI, M. et al. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 131-5, 2011.

MATIAZI, H. J. **Otimização de extração de glucana da parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* e sua ação hipocolesterolemica e antimutagênica.** 2005. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 2005.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, p. 345-61, 1995.

MÈULLER-TIDOW, C. et al. Cyclin A1 is highly expressed in aggressive testicular germ cell tumors. **Cancer Lett.**, v. 190, n. 1, p. 89-95, 2003.

MÈULLER-TIDOW, C. et al. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. **Molecular and Cellular Biology**, p. 8917-28, Oct. 2004.

MINOTTI, G.; MENNA, P. Anthracyclines molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev.**, v. 56, p. 185-229, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-6, 1983.

MOTOKURA, T.; ARNOLD, A. Cyclins and oncogenesis. **Biochem Biophys Acta.**, v. 1155, p. 63-78, 1993.

NAKAGAWA, Y.; OHNO, N.; MURAI, T. Suppression by *Candida albicans* β -glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 710-3, 2003.

NOOR, R.; MITTAL, S.; IQBAL, J. Superoxide dismutase: applications and relevance to human diseases. **Med. Sci. Monit.**, v. 8, p. 210-5, 2002.

NOVAES, M. R. C. G. et al. The effects of dietary supplementation with *Agaricales* mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence-based medicine. **Clinics.**, v. 66, n. 12, p. 2133-9, 2011.

OBERLEY, T. D.; OBERLEY, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histopathol**, v. 12, p. 525-35, 1997.

- OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases(SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 388-93, 2001.
- OKAMOTO, T.; KODOI, R.; NONAKA, Y. Lentinan from shiitake mushroom (*lentinus edode*) suppresses expression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. **Biofactors**, v. 21, p. 407-74, 2004.
- OLIVEIRA, R. J. et al. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 41-52, 2007.
- OTTEWELL, P. D. et al. Sustained inhibition of tumor growth and prolonged survival following sequential administration of doxorubicin and zoledronic acid in a breast cancer model. **Int. J. Cancer**, v. 126, p. 522-32, 2009.
- PATCHEN, M. L. et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by betafectin PGG-glucan alone and in combination with granulocyte colony-stimulating factor. **Stem Cells**, v. 16, p. 208-17, 1998.
- PELIZON, A. C. et al. Immunomodulatory activities associated with β -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiol. Res.**, v. 54, p. 557-64, 2005.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.
- QUILES, J. L. et al. Antioxidants nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 79-95, 2002.
- RIVERA, A. et al. Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 63, n. 12, p. 1425-39, 2006.
- ROSENBERG, A. R. et al. Overexpression of cyclin a A advances entry into S phase. **Oncogene**, v. 10, p. 1501-9, 1995.
- SANDULA, J.; MACHOVÁ, E.; HRIBALOVÁ, V. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana and its water-soluble derivatives. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 323-6, 1995.
- SANKALA, H. M. et al. Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. **Cancer Res.**, v. 67, p. 10466-74, 2007.
- SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutical potential. **Int. Immunopharmacol**, v. 6, p. 317-33, 2006.
- SENER, G. et al. Protective effect of betaglucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. **Int. Immunopharmacol**, v. 5, p. 1387-96, 2005.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-9, 1999.

SILBER, R. et al. Metabolic activation of N-acylanthracyclines precedes their interaction with DNA topoisomerase II. **NCI Monogr.**, v. 4, p. 111-5, 1987.

SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNECEVIC-VUKCEVIC, J. Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. **Mutation Res.**, v. 402, p. 52-7, 1998.

SLAMENOVÁ, D. et al. Protective effects of fungal (1-3)-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Let.**, v. 198, p. 153-60, 2003.

TAKAHASHI, H. et al. Association of immunological disorders in tethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. **Immun. Med. Microb.**, v. 31, p. 1-14, 2001.

TOHAMY, A. A. et al. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. **Mutation Res.**, v. 541, p. 45-53, 2003.

TOKLU, H. Z. et al. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, p. 156-69, 2006.

VAN DER VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002.

WANG, J. et al. Transcriptional analysis of doxorubicin induced cytotoxicity and resistance in human hepatocellular carcinoma cell lines. **Liver Int.**, v. 29, n. 9, p. 1338-47, 2009.

WEGIEL, B. et al. Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 100, p. 1022-36, 2008.

WEGLARZ, L. et al. Quantitative analysis of the level of p53 and p21(WAF1) mRNA in human colon cancer HT-29 cells treated with inositol hexaphosphate. **Acta Biochima Polonica**, v. 53, n. 2, p. 349-56, 2006.

WILLIAMS, D. L. et al. Inhibiting early activation of tissue nuclear factor- κ B and nuclear factor interleukin 6 with (1-3)- β -D-glucan increases long-term survival in polymicrobial sepsis. **Surgery**, v. 126, p. 54-65, 1999.

YAMAMOTO, K. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of β -1,3-D-glucan purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, p. 259-63, 2009.

YANG, J. H. et al. Antioxidant properties of fermented soybean broth. **Food Chemistry**, Barking, v. 71, p. 249-54, 2000.

ZHANG, M. et al. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 4, p. 455-62, 2006.

6 ARTIGO 2

EFEITOS DA β -GLUCANA SOBRE OS PARÂMETROS NUTRICIONAIS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA, ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO¹

Resumo: O interesse crescente nas β -glucanas (β G) nas últimas décadas surge de suas propriedades funcionais e bioatividade. Alguns estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da β G na hipercolesterolemia, hiperglicemia e na hipertensão arterial, ressaltando que não houve efeitos adversos relatados após o consumo de uma dieta rica em β G. Nesse sentido o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação da β G sobre os parâmetros nutricionais, hematológicos, bioquímicos e indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama. Foram acompanhadas 52 pacientes antes e após a suplementação de um grama de β -glucana ou gelatina, durante 84 dias de tratamento quimioterápico. A média de idade foi de $52,04 \pm 8,97$ anos, a maioria não ingeriam bebidas alcoólicas, não eram tabagistas e não praticavam atividade física regular. A avaliação nutricional identificou prevalência de sobrepeso e obesidade, com risco elevado de complicações metabólicas e doença cardiovascular, entretanto não houve diferença significativa antes e após a suplementação. Houve aumento significativo nos níveis hematológicos após a suplementação com β G: hemoglobina ($p=0,031$), hematócrito ($p=0,021$), basófilos ($p<0,001$) e eosinófilos ($p=0,005$) e redução significativa nos níveis plasmáticos de LDL - colesterol ($p=0,021$) e dos triacilgliceróis ($p=0,005$), entretanto, no grupo controle (gelatina) houve redução significativa nos níveis de hemoglobina ($p=0,013$), leucócitos ($p=0,001$), linfócitos ($p<0,001$) e eosinófilos ($p=0,046$). A análise dos marcadores de estresse oxidativo indicou redução significativa nas concentrações plasmáticas de NO ($p<0,001$) após a suplementação com β -glucana. Portanto a suplementação de um grama de β -glucana em mulheres com câncer de mama, por 84 dias, não alterou o estado nutricional das pacientes e melhorou significativamente os níveis hematológicos, reduziu LDL-col, triacilgliceróis e concentrações plasmáticas de NO. Diante do exposto, sugere-se que a β G de *Saccharomyces cerevisiae* possa ser um importante nutriente adjuvante para pacientes com câncer em terapia antineoplásica.

Palavras-chave: β -glucana. Câncer de mama. Avaliação nutricional. Indicadores de estresse oxidativo. Tratamento antineoplásico.

¹ Artigo científico escrito pelos autores: Clisia Mara Carreira (Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina), Dora Silvia Correa de Moraes (Departamento de Patologia e Análises Clínicas, Universidade Estadual de Londrina), José Oliveira Couto Filho (Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Estadual de Londrina), Jane Bandeira Dichi (Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Londrina), Hevenilton José Matiazi (Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina), Edson Lavabo (Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual de Londrina), Mário Sérgio Mantovani (Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina).

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a β -glucana foi um foco de intensa pesquisa, principalmente por oferecer uma resposta segura sendo considerada um potente modificador biológico (PETRAVIĆ-TOMINAC, 2010). A ingestão de β -glucana tem sido associada à redução do risco de câncer, a redução da atividade inflamatória e da hipercolesterolemia (LIN et al., 2004; BEHALL et al., 2006; KIM et al., 2006a; MAGNANI; QUEENAN et al., 2007; CASTRO-GÓMEZ, 2008; HYUNSOOK et al., 2009), promove melhora da resposta imunológica pela ativação de macrófagos exercendo um efeito benéfico sobre infecções de origem bacteriana (TZIANABOS; CISNEROS, 1996), viral (REYNOLDS et al., 1980), fúngica (MEIRA et al., 1996) e parasitária (HOLBROOK et al., 1981). Esta substância também tem propriedade moduladora, tanto da imunidade humoral quanto da celular (FALCH et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; KUBALA et al., 2003) sendo capaz de estimular a hematopoiese (HOFER; POSPISIL, 1997; KOGAN et al., 2002; WEITBERG, 2008) além de neutralizar radicais livres (KAYALI et al., 2005, SENER et al., 2006).

As β -glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia. A β -glucana da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, tem como função manter a rigidez e a forma da célula. constitui-se de um esqueleto central linear, de moléculas de D-glicose ligadas na posição β -(1 \rightarrow 3), contendo cadeias laterais com ligações β -(1 \rightarrow 6) (SANDULA et al., 1995, GARDINER, 2000).

A Investigação sobre atividade biológica da β -glucana de diferentes tipos em nível celular tem sido base para experimentos científicos com animais, testes *in vitro* e ensaios clínicos. Muitos estudos confirmaram que a β -glucana administrada por via oral, melhora a imunidade demonstrando que é um modulador não-tóxico de vários processos imunológicos. Dessa forma, estudar a resposta do sistema imunitário humano em relação as β -glucanas extraídas de várias fontes tem sido um desafio para os pesquisadores. Identificar quais receptores e as vias intracelulares ativas envolvidas, parece estar relacionada aos fatores físico-químicos, tais como, peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização (TOKUNAKA et al., 2002; KUBALA et al., 2003).

Por outro lado, Maki et al, (2006), em ensaio clínico controlado, avaliaram os efeitos do consumo de aveia (β -glucana) sobre a pressão arterial, metabolismo de

carboidratos e os biomarcadores de estresse oxidativo em 97 homens e mulheres obesos com hipertensão arterial. Os indivíduos foram divididos em dois grupos, os que receberam a aveia e o grupo controle e foram acompanhados por 12 semanas. Os resultados do ensaio sugerem efeitos benéficos de alimentos contendo β -glucanas sobre o metabolismo de carboidratos e sobre a pressão arterial em indivíduos obesos.

Além desses achados, a β -glucana ainda parece ser uma forte candidata a auxiliar a prevenção de danos ao DNA, sejam eles basais e/ou induzidos por tratamentos, como é o caso da quimioterapia. Recente estudo realizado por Magnani et al., (2011), com 20 pacientes portadores de câncer de próstata receberam cápsulas contendo 20 mg de β -glucana derivada de *S. cerevisiae* por 28 dias. Amostra de sangue periférico foi coletada para análise dos leucócitos e para o teste do cometa. Os resultados foram positivos, indicando que a β -glucana pode ser eficiente protetora contra danos ao DNA causados por compostos mutagênicos, ou seja possui capacidade de bloquear a ação de agentes indutores de promovendo o reparo do DNA, melhorando os parâmetros hematológicos de pacientes com câncer de próstata em tratamento qntineoplásico.

Considerando as propriedades benéficas da β -glucana e seu potencial uso como adjuvante para o tratamento de câncer, nós avaliamos os efeitos da suplementação oral de β -glucana sobre os parâmetros nutricionais, hematológicos, bioquímicos e os indicadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama em tratamento antineoplásico.

PARTICIPANTES E MÉTODOS

Sujeitos

Participaram do estudo mulheres com câncer de mama, atendidas no ambulatório do Instituto de Câncer de Londrina (ICL), Estado do Paraná, no período de 2008 a 2010, submetidas a tratamento clínico e quimioterápico adjuvante. Como critérios de inclusão foram considerados: mulheres com diagnóstico de câncer de mama confirmado e que foram submetidas à quimioterapia, tendo entre dezoito e sessenta e cinco anos. Foram excluídas as mulheres em estadiamento IV da doença e as que apresentaram outras patologias crônicas e distúrbios hormonais. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina sob o número: 006/07 (Anexo 1).

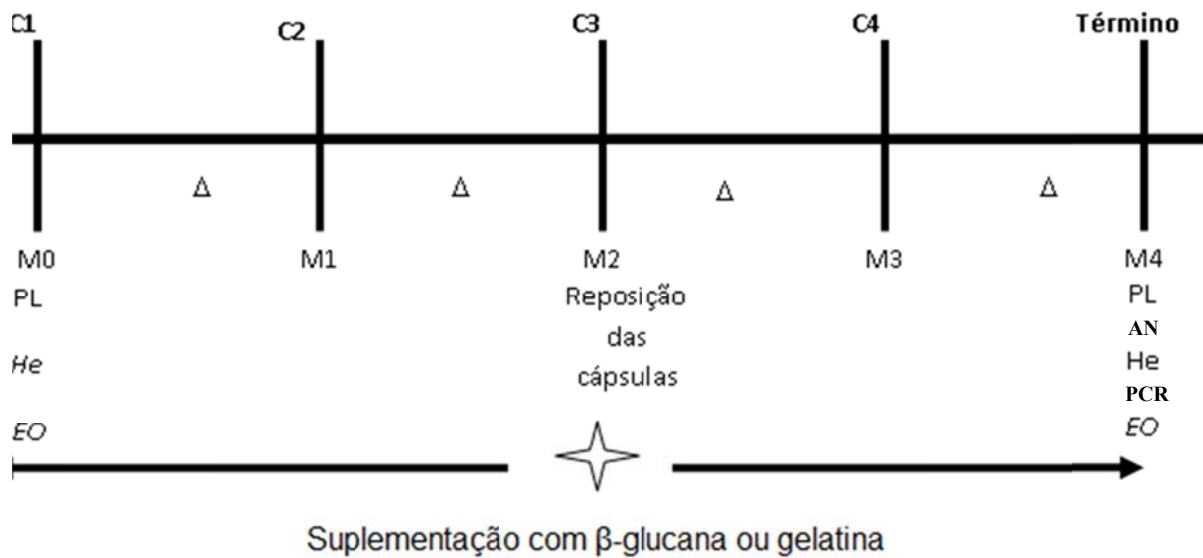
Em relação ao estadiamento clínico, a neoplasia de mama foi classificada de acordo com o tamanho do tumor, acometimento de linfonodos regionais e metástase à distância, em estágios: 0, I, II, III e IV (INCA, 2004).

Protocolo Experimental

Trata-se de um ensaio clínico aleatório duplo cego, com duas intervenções paralelas. Para homogeneizar a amostra todas as pacientes receberam a suplementação por um período de 84 dias. Foram realizados três encontros para coleta de sangue, avaliação nutricional, fornecimento das cápsulas e investigação de efeitos colaterais (Figura 1). As pacientes foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: β -glucana (intervenção) composto por 25 pacientes, que receberam a suplementação oral de um grama de β -glucana, em cápsulas, e o grupo controle constituído por 27 pacientes, que receberam a mesma quantidade de gelatina em cápsulas.

Durante a avaliação nutricional as pacientes receberam todas as orientações necessárias em relação à suplementação e levaram os frascos contendo as cápsulas com β -glucana ou com gelatina, foram orientadas a ingerir duas cápsulas por dia, totalizando um grama de suplemento. Também foram orientadas a não modificarem sua dieta habitual e não ingerir outros suplementos nutricionais durante o desenvolvimento do estudo. A β -glucana utilizada apresentava pureza de 87,6%, conforme descrito por Matiazi (2005), sendo fornecida pelo próprio pesquisador. A gelatina em pó foi adquirida da Galena Química e Farmacêutica LTDA, Campinas, SP, Brasil e o encapsulamento das substâncias foram realizados no Laboratório de Produção de Medicamentos da UEL, pela própria pesquisadora.

Figura 1 - Esquema de acompanhamentos das pacientes durante o ensaio clínico



Legenda: Δ período de 21 dias; C1, C2, C3, C4: Ciclos de Quimioterapia (QT); M0 – Coleta basal de sangue periférico (hemograma, bioquímica, estresse oxidativo); Avaliação nutricional inicial. M1, M2, M3 – Sessão de QT e retorno com a nutricionista para a reposição das cápsulas e avaliação nutricional. M4 – Coletas de sangue periférico final (hemograma, bioquímica, estresse oxidativo), Avaliação nutricional final, PL – Perfil Lipídico; He – Hemograma; EO – Estresse Oxidativo; PCR: Proteína C reativa; AN – Avaliação Nutricional.

Parâmetros avaliados

As seguintes medidas foram avaliadas: peso, altura, circunferência da cintura e dobras cutâneas para a realização dos cálculos do IMC, percentual de gordura corporal e análise da circunferência da cintura como indicador de risco cardiovascular. As medidas antropométricas foram obtidas pelo mesmo avaliador, experiente e treinado. Cada paciente teve duas avaliações, uma antes da suplementação (basal) e outra após o término da suplementação (final).

O diagnóstico do estado nutricional foi realizado por meio do IMC, e classificado de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995). Para a avaliação da circunferência da cintura, utilizou-se a classificação proposta pelo NCEP-ATPIII (2001), que considera para mulheres valores ≥ 88 cm como risco elevado de complicações metabólicas associadas à obesidade e valores < 88 cm, sem risco. Em relação à classificação da porcentagem de gordura corporal seguiu-se o critério proposto por LOHMAN et al (1991) que considera risco de doenças associadas à obesidade o percentual de gordura corporal ≥ 32 .

As mensurações laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínica -Cetel, antes e após a suplementação, com 12 horas de jejum. Foi avaliado o hemograma completo, os níveis séricos de glicose, colesterol total (CT), colesterol LDL, colesterol HDL, triacilgliceróis (TG) e proteína C-reativa (PCR), conforme protocolo do fabricante.

Os indicadores de estresse oxidativo foram analisados no Laboratório de Pós-Graduação do Hospital Universitário da UEL. As substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas conforme descrito por Jentzsch et al (1996) e os resultados foram expressos como μmol de MDA. O Óxido Nítrico (NO) foi determinado pelas concentrações de nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3) plasmáticos pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Griess suplementado com a redução de nitrato a nitrito com cádmio. Os Produtos Avançados de Oxidação Protéica (AOPP) foram determinados pelo método espectrofotométrico descrito por Witko-Sarsat et al (1998). E por fim o potencial antioxidante plasmático total (TRAP) foi avaliado por quimiluminescência (QL) em contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, em uma adaptação técnica descrita por Repetto et al (1996).

Análise Estatística

Os dados foram resumidos por meio da mediana e quartis (25% e 75%) ou pela frequência absoluta e relativa expressa em tabelas. Para a comparação das variáveis contínuas foram utilizados os testes de mann-withney ou wilcoxon e para comparação das variáveis categóricas o teste do qui-quadrado ou o teste exato de fisher. O nível de significância foi estabelecido em 0,05. O software utilizado para análise foi o SPSS v.16.

RESULTADOS

Do total de 80 pacientes recrutadas para o estudo, 25 foram randomizadas para o grupo de intervenção β -glucana e 27 para o grupo controle (gelatina). A Tabela 1 resume as principais características basais das pacientes, de acordo com o grupo de suplementação. Os hábitos de vida avaliados foram consumo de bebida alcoólica, tabagismo e prática de atividade física, que mostraram baixo consumo de álcool e de fumantes, mas com alta prevalência de sedentarismo, a amostra foi homogênea entre os grupos de estudo para as

vaiáveis apresentadas. A idade média das pacientes do grupo β -glucana foi de $51,7 \pm 8,8$ anos e do grupo controle $54,1 \pm 9,1$ anos. Não houve diferença significativa entre os grupos, observe-se que a amostra foi homogênea entre os grupos de estudo.

Tabela 1 - Distribuição percentual das variáveis demográficas, estadiamento clínico e hábitos de vida de acordo com os grupos de estudo, Londrina, 2008-2010.

Variáveis	Categorias	Grupo β -glucana n = 25		Grupo controle n = 27		*p-valor
		N	%	N	%	
Grupo etário (anos)	20 - 39	2	8	2	7	0,88
	40 - 59	16	64	16	59	
	60 - 65	7	28	9	34	
Renda Familiar	Até 1 SM	14	56	15	55,6	0,87
	1-3 SM	9	36	12	44,4	
	> 3 SM	2	8	0		
Estadiamento Clínico	I	3	12	1	3,7	0,43
	II	16	64	13	48,1	
	III	6	24	13	48,1	
Tabagismo	Não	21	84	22	81,5	0,98
	Sim	4	16	5	18,5	
Prática de Atividade física	Não	22	88	23	85,2	0,92
	Sim	3	12	4	14,8	

Legenda: *p-valor: nível de significância $p < 0,05$.

A classificação do estado nutricional das pacientes de acordo o IMC está descrita na Tabela 2. O IMC médio do grupo β -glucana foi de $25,36 \pm 4,27$ kg/m² e do grupo controle foi de $26,05 \pm 4,73$ kg/m² que corresponde ao estado nutricional de sobrepeso. Após o período de intervenção (final) não houve alteração significativa na classificação do estado nutricional. Com relação ao risco elevado de complicações metabólicas associadas à obesidade, medido pela circunferência da cintura, inicialmente a minoria das pacientes dos dois grupos apresentaram alto risco, mas no final do estudo, a maioria das pacientes apresentou alto risco. Entretanto a comparação entre os grupos revelou que o grupo controle apresentou maior percentual de pacientes em risco de complicações metabólicas associadas à obesidade (basal e final) em relação ao grupo β -glucana, mas a diferença não foi significativa. O percentual de gordura corporal foi acima de 32% nos dois grupos, indicando excesso de gordura corporal e risco elevado de obesidade.

Tabela 2 - Distribuição percentual do IMC e circunferência da cintura das mulheres com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010

Variáveis	Classificação	Grupo β -glucana n = 25					Grupo controle n =27				
		Basal		Final		p-valor*	Basal		Final		p-Valor*
		n	%	n	%		n	%	n	%	
IMC (kg/m ²)	Desnutrido (<18,5)	01	4,0	01	4,0	1,0	01	3,7	00	0,0	0,93
	Eutrófico (18,5-24,9)	09	36,0	09	36,0	1,0	06	22,2	07	25,9	0,76
	Sobrepeso(25-29,9)	10	40,0	10	40,0	1,0	11	70,7	10	37,4	0,45
	Obeso (\geq 30)	05	20,0	05	20,0	1,0	09	33,3	10	37,4	0,54
Circunf. da cintura (cm)	Baixo risco (< 88)	16	64,0	15	60	0,94	15	55,5	12	44,5	0,68
	Alto risco (\geq 88)	09	36,0	10	40	0,88	12	44,5	15	55,5	0,54

Legenda: * p-valor: nível de significância $p < 0,05$.

A análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos realizada antes e após a suplementação está descrita na Tabela 3. No grupo β -glucana houve aumento significativo nos níveis de hemoglobina ($p=0,031$), hematócrito ($p=0,021$), basófilos ($p<0,001$) e eosinófilos ($p=0,005$) e redução significativa nos níveis de LDL-colesterol ($p=0,021$) e dos triacilgliceróis ($p=0,005$) e no grupo controle houve redução significativa nos níveis de hemoglobina ($p=0,013$), leucócitos ($p=0,001$), linfócitos ($p<0,001$) e eosinófilos ($p=0,046$). A análise dos indicadores de estresse oxidativo está descrita na Tabela 4. Constatou-se redução significativa nas concentrações de NO ($p<0,001$) após a suplementação com β -glucana. Os demais marcadores não apresentaram alterações significantes.

Tabela 3 - Valores da mediana e quartis do hemograma e parâmetros bioquímicos das pacientes com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010.

Variáveis	Grupo β -glucana n = 25			Grupo controle n =27		
	Basal Md (1°- 3° q)	Final Md (1°- 3° q)	p- valor*	Basal Md (1°- 3° q)	Final Md (1°- 3° q)	p- valor*
HB (g/dL)	12,2 (11,7-13,5)	12,4 (10,5-12,7)	0,031	12,9 (12,3-13,8)	12,4 (11,1-12,9)	0,013
HT (%)	36,7 (32,4-38,1)	37,4 (35,3-39,9)	0,021	38,8 (37-40,9)	37,1 (34,8-40,8)	0,056
Lt (mm ³)	5740 (4730-7880)	6030 (4480-8330)	0,667	6500 (5300-7700)	5040 (4060-6800)	0,001
Li (mm ³)	1500 (1254-2072)	1622 (1271-2019)	0,696	2080 (1486-2390)	1503 (1049-1712)	<0,001
Mn (mm ³)	460 (342-611)	502 (336,5-761)	0,634	510 (380-567)	509 (373-770)	0,798
Ba (mm ³)	48 (0-81)	77 (49-86)	<0,001	50 (0-100)	54 (0-94)	0,454
Es (mm ³)	66 (11-140)	115 (70-180)	0,005	62 (18-161)	52 (13-110)	0,046
Plaq (mil/ μ L)	294 (262-321)	280 (267-318)	0,872	357(315-386)	334(292-359)	0,067
Glico(mg/dl)	91,0 (84,5-95,5)	87,0 (83,0-95,5)	0,652	93,0 (86,0-102,7)	95,0 (84,7-98,0)	0,987
CT (mg/dL)	208 (182-233)	208 (186-255)	0,226	189 (173-237)	213 (194-243)	0,105
LDL (mg/dL)	141 (122-175)	127 (102-169)	0,021	123 (103-155)	133 (115-168)	0,225
HDL (mg/dL)	50 (42-57)	46 (40-58)	0,648	48 (42-60)	46 (40-53)	0,548
TG (mg/dL)	154 (108-201)	121 (74-165)	0,005	130 (89-164)	119 (96-174)	0,692
PCR (mg/dL)	0,43 (0,33-0,63)	0,41 (0,31-0,66)	0,346	0,46 (0,33-0,63)	0,46 (0,33-0,63)	0,866

Legenda: HB: hemoglobina; HT: hematócrito; Lt: leucócitos; Li: linfócitos; Mn: monócitos; Ba: basófilos; Es: eosinófilos; Plaq: plaquetas; CT: colesterol total; LDL: colesterol-LDL; HDL: colesterol-HDL; TG: triacilgliceróis; PCR: proteína C reativa. Md: mediana; q: quartis.* p-valor: nível de significância estatística $p < 0,05$ em negrito.

Tabela 4 - Valores da mediana e quartis dos marcadores do estresse oxidativo das pacientes com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010.

Marcadores do estresse oxidativo	Grupo β -glucana n = 25			Grupo controle n =27		
	Basal Md (1°- 3° q)	Final Md (1°- 3° q)	p- valor*	Basal Md (1°- 3° q)	Final Md (1°- 3° q)	p- valor*
TRAP (μ M Trolox)	592 (525-720)	634 (567-736)	0,619	608 (529-712)	622 (562-696)	0,657
MDA (μ M)	2,74 (1,05-3,25)	2,50 (1,8-4,3)	0,258	2,04 (1,4-3,1)	2,12 (1,3-3,13)	0,657
ON (μ g/mL)	6,95 (4,6-7,9)	5,15 (3,8-6,9)	<0,001	5,5 (4,4-7,7)	6,2 (4,4-8,3)	0,73
AOPP (μ M/L ECT)	307 (241-375)	326 (264-359)	0,809	367 (306-469)	358 (273-432)	0,761

Legenda: TRAP: Potencial antioxidante plasmático total; MDA: malonaldeído; ON: Óxido Nítrico; AOPP: produtos avançados de oxidação protéica: μ M/L EcT=micromoles/litro de equivalentes de cloramina T. Md: mediana; q: quartis.* p-valor: nível de significância estatística $p < 0,05$ em negrito.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente ensaio fornecem suporte para observar que a suplementação de um grama de β -glucana de *S.cerevisiae*, por 84 dias, teve efeitos favoráveis sobre os níveis plasmáticos de hemoglobina, hematócrito, basófilos, eosinófilos, LDL-colesterol e triacilgliceróis e sobre a concentração plasmática de NO.

No ensaio de Weitberg (2008), vinte pacientes, recebendo quimioterapia, foram suplementados com uma preparação contendo três gramas de β -(1,3)-(1,6) D-glucano (MacroForce mais IP6, ImmuDyne, Inc.) e monitorados para tolerabilidade e efeito sobre a hematopoiese. Os resultados mostraram que β -glucana foi extremamente bem tolerada pelos pacientes com neoplasias em estado avançado submetidos a quimioterapia. Não houve efeitos adversos ou toxicidades relatados por qualquer um dos pacientes quando em comparação com o seu perfil de sintomas antes de entrar no estudo. Pelo contrário, um número significativo de pacientes relatou uma sensação de bem-estar. Esses achados são consistentes com os de Oliveira et al. (2006) que avaliou a β -glucana (1/3-1/6) e não mostrou qualquer efeito genotóxico e/ou danos clastogênicos, podendo se tornar um importante adjuvante na quimioterapia uma vez que tem a capacidade de diminuir os efeitos adversos das drogas (OLIVEIRA et al., 2006).

Alguns estudos têm demonstrado relação direta entre obesidade e incidência de câncer de mama em fase pré-menopausal. Além disso, o ganho de peso, após o diagnóstico da doença, pode afetar a sobrevivência das pacientes, e está relacionado ao aumento na progressão do tumor e nas taxas de mortalidade associadas à neoplasia mamária (BERGSTROM et al., 2001).

A avaliação do estado nutricional das pacientes foi realizada pela classificação do IMC, proposta pela WHO (1995), circunferência da cintura e % de gordura corporal. Em relação ao IMC, 40,4% das pacientes com câncer de mama apresentou diagnóstico de sobrepeso e 26,9% de obesidade antes da suplementação. Os outros parâmetros utilizados indicaram presença de obesidade e risco elevado de complicações metabólicas e doença cardiovascular, mas não houve diferença significativa na comparação entre os dados basais e finais e entre os grupos, sugerindo que a β -glucana não interferiu no diagnóstico nutricional das pacientes com câncer de mama ao longo do estudo. Entretanto observou-se que o IMC médio das pacientes não esteve de acordo com as recomendações oficiais contidas no relatório de perspectiva global sobre alimentos, nutrição e prevenção do câncer, uma vez

que a recomendação de IMC para prevenção de câncer de mama é entre 18,5-24,9 kg/m², com mediana indicada de 21 a 23 kg/m² (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007).

No estudo de Pierce et al. (2007) foram avaliadas 1490 mulheres com câncer de mama e constataram que o IMC foi relacionado positivamente com o índice de mortalidade, indicando que as mulheres com IMC ≥ 30 kg/m² apresentaram taxa de mortalidade mais elevada em relação aquelas com peso adequado. No trabalho conduzido por Goodwin e Boyd (1990), em que foram analisados treze estudos de coorte e um estudo de caso controle realizados em mulheres com câncer de mama, verificou-se que o aumento no peso corporal pode exercer um efeito negativo no prognóstico da doença. Rock e Demark-Wahnefried (2002) avaliaram resultados de 26 estudos que relacionaram o estado nutricional (estimado pelo IMC) na fase de diagnóstico da doença com sobrevivência e recorrência de câncer de mama. Em 17 dos 26 estudos, o aumento no IMC ou peso corporal elevou, significativamente, o risco de recorrência e reduziu a sobrevivência em pacientes com câncer de mama; 7 estudos não encontraram nenhuma associação; e 2 estudos apresentaram uma associação inversa entre o excesso de peso corporal e recorrência.

Em uma revisão sistemática, Hauner et al. (2011) analisaram o efeito do excesso de peso e da nutrição no prognóstico no câncer de mama e identificaram 17 estudos de coorte. Seis de 12 estudos indicaram uma associação positiva entre o IMC e a mortalidade específica por câncer de mama, três estudos mostraram tendência e apenas três estudos não encontraram qualquer associação significativa. Os efeitos da β -glucana na ingestão alimentar parece ser dependente de suas propriedades, o aumento da saciedade é em grande parte atribuído ao tamanho molecular e a solubilidade da β -glucana. À medida que o efeito de β -glucana sobre a saciedade ainda não é claro, a sua ação na regulação do peso corporal também é incerto.

Frente ao exposto, cabe ainda destacar que o excesso de peso tem sido associado com aumento nos níveis de triacilgliceróis, VLDL, colesterol total, LDL-colesterol e diminuição da HDL-colesterol, sendo considerada uma importante causa de doença cardiovascular e diabetes (DENKE et al 1994). Dessa forma conhecer o perfil hematológico e bioquímico de indivíduos com câncer de mama, e os possíveis riscos relacionados a doenças coronarianas inflamação e infecções se faz necessário.

A β -glucana derivada de cereais (aveia e cevada) tem sido utilizada para reduzir o risco de doenças cardíacas (RIPSIN et al., 1992; BROWN et al., 1999; MARLETT, 2001; KIN et al., 2006), estudo com animais utilizando a glucana proveniente da *S. cerevisiae* demonstrou a mesma eficácia, com a vantagem de manter seu efeito por um período maior em

relação às glucanas de outras origens (VETVICKA; VETVICKOVA, 2007). Nossos resultados mostraram que as pacientes do grupo β -glucana apresentaram redução significativa nos níveis plasmáticos de LDL-colesterol ($p=0,021$) e triacilgliceróis ($p=0,005$), após suplementação, enquanto que no grupo controle não houve alteração significativa.

Em todo o mundo estudos em humanos têm demonstrado que a β -glucana é uma fonte alimentar segura e barata e pode ser utilizada em indivíduos com dislipidemia, devido suas propriedades de reduzir o colesterol total, LDL-Col e triacilgliceróis, contribuindo assim, para redução de doenças cardiovasculares (DELANEY et al., 2003; KIM et al., 2006; SOL'A et al., 2007; QUEENAN et al., 2007; SHIMIZU et al., 2008).

Em uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados, o consumo de 3 a 10g de cevada por dia, ao longo de 4 a 6 semanas, reduziu de forma significativa o colesterol total e LDL-colesterol em indivíduos com diferentes padrões alimentares (ABUMWEIS; JEW; AMES, 2010). Em outra meta-análise de 8 ensaios clínicos randomizados, os participantes receberam 3 a 10g de cevada por dia, ao longo de um período que varia entre 4 e 12 semanas e apresentaram reduções significativas nos níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides em comparação com os participantes do grupo controle (TALATI, et al., 2009). O consumo de 6 g/dia de aveia concentrada em β -glucana na forma de pó, durante 6 semanas, reduziu significativamente tanto colesterol total quanto o LDL-Col, em adultos hipercolesterolêmicos (QUEENAN et al., 2007), em outro estudo, o consumo de uma dose diária de 4g de β -glucana de aveia, incorporada a uma refeição pronta (sopa), reduziu os níveis de colesterol LDL em 3,7% ao longo de 5 semanas em um grupo de indivíduos saudáveis hiperlipidêmicos, em comparação com uma dieta controle (BIORKLUND; HOLM, 2008).

Ainda são poucos os estudos realizados com β -glucana de *S. cerevisiae*, um deles, foi de Nicolosi et al. (1999) que estudaram os efeitos da ingestão de β -glucana de *S. cerevisiae*, adicionada ao suco de laranja, para os níveis de lipídios plasmáticos em homens obesos hipercolesterolêmicos. No estudo foi observada queda significativa no colesterol total e redução de 8% nos níveis séricos de colesterol LDL, após 8 semanas de consumo. Semelhantes observações foram descritas por Matiazi (2005) na avaliação do efeito hipocolesterolêmico da β -glucana extraída de *S. cerevisiae* administrada em camundongos com dieta hipercolesterolêmica.

As propriedades hipocolesterolêmicas das β -glucanas podem ser explicadas por vários mecanismos, como o aumento na excreção de ácido biliar, alteração da composição do pool de ácidos biliares e aumento da atividade da colesterol 7α -hidrolase, principal enzima

que conduz a eliminação do colesterol no corpo (GOEL et al., 1999). São capazes de diminuir a reabsorção dos ácidos biliares e aumentar o seu transporte para o intestino grosso (ZHANG et al., 1992) promovendo sua conversão para metabólitos e sua excreção, subsequentemente induzindo aumento da síntese hepática de ácidos biliares a partir do colesterol circulante (DONGOWSKI; HUTH; GEBHARDT, 2003). Em um estudo in vitro, extratos de β -glucana de farinha de aveia e cevada inibiu a absorção intestinal de ácidos graxos de cadeia longa e colesterol e diminuiu a regulação de vários genes envolvidos na lipogênese e no transporte lipídico em ratos (DROZDOWSKI et al., 2010).

Outra linha de pesquisa importante sobre as atividades das β -glucanas é seu uso para estimulação e modulação imunológica, embora as pesquisas realizadas até agora, consistiram principalmente de estudos in vitro utilizando células humanas de câncer e estudos com animais, os resultados têm mostrado melhorar principalmente a hematopoiese (CHAN; CHAN; SZE, 2009).

Por outro lado no estudo realizado por Demir et al (2007) foi observado aumento significativo (de 48-50% para 61-69%) na produção de monócitos em 23 mulheres com câncer de mama avançado após 15 dias de ingestão de β -glucana. Nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de hemoglobina ($p=0,031$), hematócrito ($p=0,021$), basófilos ($p<0,001$) e eosinófilos ($p=0,005$) após 12 semanas de ingestão de um grama de β -glucana, enquanto que as pacientes do grupo controle apresentaram redução significativa de hemoglobina ($p=0,013$), leucócitos ($p= 0,001$), linfócitos ($p<0,001$) e eosinófilos ($p=0,046$).

Os prováveis mecanismos envolvidos na resposta imune desencadeada pela β -glucana incluem estímulo da hematopoiese (HOFER; POSPISIL, 1997; WEITBERG, 2008), secreção de TNF e IL-1, que se ligam nos receptores de macrófagos e neutrófilos (KUPFAHL; GEGINAT; HOF, 2006) aumentando a atividade de células *Natural Killer* (NK). Também é capaz de interferir na angiogênese tumoral, podendo assim, inibir a promoção e a progressão dos tumores (XIAO; TRINCADO; MURTAGH, 2004; VOLMAN et al., 2008) e ainda suprimir a peroxidação lipídica e repõem conteúdo de glutathiona (GSH) nos tecidos oxidados (TOKLU et al., 2006). Neste contexto, Kubala et al. (2003) relataram que a modulação da atividade celular da β -glucana inicia-se com a ativação de macrófagos gastrointestinais, células endoteliais e dendríticas, células B e T, e, linfócitos polimorfonucleares.

No estudo de Weitberg (2008) (ensaio clínico de fase I/II), foram utilizados 7,5mg de β -(1-3), (1-6)-D-glucana no tratamento de pacientes com neoplasias avançadas,

submetidos à quimioterapia. Os resultados apontaram melhora, especialmente no número de glóbulos brancos, dos níveis de hemoglobina e de plaquetas, concluindo que a β -glucana pode ter um efeito benéfico sobre a hematopoiese nestes pacientes.

Dessa forma os pesquisadores acreditam que os efeitos benéficos devem ser melhor estudados, porque, se confirmados, a β -glucana, poderia se tornar uma importante substância adjuvante em pacientes que recebem quimioterapia e assim limitar as citopenias observadas com estas terapias. As dosagens de β -glucana recomendadas diferem, a partir de 300 a 3000 mg por dia, dependendo das características e potenciais imunostimulante das preparações aplicadas. No tratamento do câncer ou outros problemas crônicos de saúde, Mason (2001) sugere a ingestão de 300-500 mg de β -(1-3),(1-6)-Dglucana de leveruda por dia durante pelo menos um ano. Alguns pesquisadores demonstraram que tanto a administração oral quanto parenteral de β -glucanas têm efeitos semelhantes na proteção contra o câncer (HANAUE et al., 1989; VETVICKA et al., 2002; RICE et al., 2005).

Evidências científicas apontam que o sobrepeso e alguns componentes da dieta podem estar relacionados com aumento no risco de desenvolvimento e progressão do câncer de mama, principalmente por induzirem a geração de radicais livres no organismo (KEY et al., 2004; DONALDSON, 2004; PINHO; COUTINHO, 2007), podendo desencadear o estresse oxidativo e, assim, aumentar o risco da doença. Por outro lado, a relação entre câncer e componentes alimentares que podem desempenhar papel protetor em relação às neoplasias ainda está sendo pesquisada (KEY et al., 2004; DONALDSON, 2004; GONZALEZ, 2006).

No presente estudo foi analisado os marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, na etapa basal e final, os resultados mostraram uma redução significativa nas concentrações de ON ($p < 0,001$) após suplementação com β -glucana.

A β -glucana de diferentes origens tem sido considerada uma fibra de potencial terapêutico diante do efeito protetor contra vários agentes químicos, podendo agir como antioxidante, prevenindo os danos produzidos por espécies reativas de oxigênio (MANTOVANI et al., 2008). Alguns estudos foram realizados para avaliar a ação da β -glucana sobre o estresse oxidativo, porém os resultados são contraditórios. Em pesquisa com cultura de células, Slamenova et al (2003) sugere a existência de propriedades antioxidantes da β -glucana. Esta atividade também foi evidenciada em estudos com animais (KAYALI et al., 2005; SENER et al., 2006), porém em ensaio clínico utilizando a β -glucana proveniente da aveia, não houve a mesma constatação (MAKI et al., 2007).

A abordagem mais comum para quantificação do estresse oxidativo e dos radicais livres tem sido por meio da determinação dos subprodutos da peroxidação lipídica como o dialdeído malônico (MDA), produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e óxido nítrico (ON), além da quantificação da capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) (VIEIRA et al., 2011).

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Estudos realizados na última década demonstraram que a β -glucana pode inibir o desenvolvimento tumoral (ROSS, et al., 1999; VETVICKA, 2001) aumentando as defesas do organismo (NAKAGAWA; OHNO; MURAI, 2003; SENER et al., 2005), interferindo na produção de citocinas (SOLTYS; QUINN, 1999; NAKAGAWA; OHNO; MURAI, 2003), óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico (HASHIMOTO, et al., 1997; LJUNGMAN et al., 1998) e melhorando a hematopoese. Também exerce efeitos radioprotetores e reduz os lipídios plasmáticos (HASHIMOTO et al., 1997; LJUNGMAN; LEANDERSON; TAGESSON, 1998; KRIZKOVA et al., 2003). Entretanto ainda não há consenso entre os pesquisadores em relação a ação direta da β -glucana sobre o estresse oxidativo.

A β -glucana tem habilidade para suprimir respostas pró-inflamatórias associadas à septicemia bacteriana, isto ocorre por meio da remoção de óxido nítrico e células produtoras de citocinas do tipo TNF- α , IL-1 e IL-6 dos locais de inflamação, e do aumento dos níveis de mediadores antiinflamatórios, como IL-10 e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1) (LEE, et al., 2002; LUHM et al., 2006).

Óxido nítrico (ON) é uma espécie reativa de nitrogênio e pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP⁺ e citrulina (TAMIR, 1996). Esse radical também pode ser produzido em maiores quantidades através dos fagócitos humanos, quando estimulados, entretanto não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido O₂ produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito. Portanto, o ON pode ser considerado potencialmente mutagênico e carcinogênico (HIRATA, 1995; AKAIKE; MAEDA, 2000; RIEDER et al., 2000).

Alguns estudos experimentais demonstraram aumento na expressão da enzima NOS em tecido maligno de tumores ginecológicos, de mama, sistema nervoso central, gástricos e colorretais, tendo um importante papel na progressão do câncer (JAISWAL et al., 2001; CIANCHI et al., 2003; CIANCHI et al., 2004; ICHINOE et al., 2004). Há evidências de que o ON produzido por células tumorais pode induzir a vaso dilatação e aumentar a angiogênese, sendo favorável ao tumor (CHATWAL et al., 1996; BUSSOLINO et al., 1996), segundo ainda esses autores o que determina a progressão ou a regressão tumoral associada ao ON seria o metabolismo da arginina pelos macrófagos intra-tumorais. Não somente a produção de ON, mas também a citotoxicidade podem ser totalmente inibidas pela adição de um inibidor específico de NOS, sugerindo que macrófagos ativados podem mediar citotoxicidade NO-dependente.

O principal mecanismo pelo qual as células endoteliais ativadas por citocinas lisam células tumorais esta associado com a produção de ON (LI et al., 1991). No câncer de mama, a atividade da ON sintase está aumentada, resultando em aumento da produção de óxido nítrico, conseqüentemente, de peroxinitrito e de seus produtos de decomposição, que podem estar relacionados à lesão do DNA (BERNSTEIN; ROSS, 1993; PAQUETTE et al., 2001; KANG, 2002).

Cabe ainda salientar a preocupação do efeito potencial dos antioxidantes em modificar a eficácia do tratamento quimioterápico, o qual depende do tipo de mecanismo de ação da droga em uso (BOREK, 2004; OZBEN, 2007;). Os quimioterápicos, com atividade ciclo fase específica, dentre eles as antraciclinas e agentes alquilantes, dependem da progressão do ciclo celular para exercer sua atividade, a interferência com a progressão do ciclo celular diminui a citotoxicidade das drogas (OZBEN, 2007). Durante o tratamento antineoplásico, a peroxidação lipídica resulta na geração de aldeídos que prolongam o ciclo celular até sua parada, interferindo com as propriedades citotóxicas dos antineoplásicos. Assim a administração de antioxidantes durante a terapia tende a diminuir o estresse oxidativo melhorando a ação dessas drogas (CONKLIN, 2004; BLOCK, 2004).

Com base nesses achados acredita-se que a β -glucana tem um papel importante na redução do estresse oxidativo, via óxido nítrico, e não interfere na eficácia do tratamento quimioterápico, entretanto pesquisas adicionais com outras doses dessa substância são necessárias, para compreender melhor os efeitos benéficos em relação ao estresse oxidativo e o câncer.

Nesse contexto concluímos que as pacientes estudadas apresentaram alto índice de sobrepeso e obesidade, com elevado risco de complicações crônicas e metabólicas.

No entanto, a administração oral de um grama de β -glucana, por 84 dias, promoveu redução dos níveis séricos de LDL-colesterol e triacilgliceróis, aumentou os níveis séricos dos parâmetros hematológicos e reduziu a concentração plasmática de óxido nítrico de pacientes com câncer de mama beneficiando o organismo comprometido pela doença e seu tratamento.

REFERÊNCIAS

ABUMWEIS, S. S.; JEW, S.; AMES, N. P. Beta-glucan from barley and its lipid-lowering capacity: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 12, p. 1472-80, 2010.

AKAIKE, T.; MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 300-8, Mar./Apr. 2000.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, p. 2486-97, 2001.

ANDRÉ, L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

BARGELLINI, A. et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, n. 17, p. 3-9, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativa e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-23, 2006.

BERGSTROM, A. et al. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. **Int. J. Cancer.**, v. 91, n. 3, p. 421-30, 2001.

BIORKLUND, M.; HOLM, J. Serum lipids and postprandial glucose and insulin levels in hyperlipidemic subjects after consumption of an oat β -glucan-containing ready meal. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 52, n. 2, p. 83-90, 2008.

BLOCK, K. I. Antioxidants and cancer therapy: furthering the debate. **Integr. Cancer Ther.**, v. 3, n. 4, p. 342-8, 2004.

BOREK, C. Antioxidants and the prevention of hormonally regulated cancer. **J. Men's Health Gender**, v. 2, p. 346-52, 2005.

BROWN, L. et al. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 30-42, 1999.

BUSSOLINO, F. et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 32A, n. 14, p. 2041-112, Dec.1996.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, London, v. 344, n. 8926, p. 862-3, 1994.

CHATWAL, V. J. et al. Nitric oxid and cancer. **Med. Hypotheses**, Edinburgh, v. 46, n. 1, p. 21-4, Jan.1996.

CIANCHI, F. et al. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.**, Chicago, v. 10, n. 8, p. 2694- 704, Apr. 2004.

CIANCHI, F. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 162, n. 3, p. 793-801, Mar. 2003.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integr. Cancer. Ther.**, v. 3, p. 294-302, 2004.

DELANEY, B. et al. β -Glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 2, p. 468-75, 2003.

DEMIR, G. et al. β -glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, p. 113-6, 2007.

DENKE, M. A.; SEMPOS, C. T.; GRUNDY, S. M. Excess body weight: an underrecognized contributor to dyslipidemia in white american women. **Arch. Intern. Med.**, v. 154, p. 401-10, 1994.

DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1-21, 2004.

DONGOWSKI, G.; HUTH, M.; GEBHARDT, E. Steroids in the intestinal tract of rats are affected by dietary-fibre-rich barley-based diets. **British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 5, p. 895-906, 2003.

DROZDOWSKI, L. A. et al. β -Glucan extracts inhibit the in vitro intestinal uptake of long-chain fatty acids and cholesterol and down-regulate genes involved in lipogenesis and lipid transport in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 695-701, 2010.

GOEL, V. et al. Dietary rhubarb (*Rheum rhaponticum*) stalk fibre stimulates cholesterol 7α -hydroxylase gene expression and bile acid excretion in cholesterol-fed C57BL/6J mice. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 65-71, 1999.

GONZALEZ, C. A. Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence. **British Journal of Nutrition**, v. 96, suppl. 1, p. 42-6, 2006.

GOODWIN, P. J.; BOYD, N. F. Body size and breast cancer prognosis: a critical review of the evidence. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 16, p. 205-14, 1990.

HANAUE, H. et al. Effects of oral lentinan on T-cells subsets in peripheral venous blood. **Clin. Therp.**, v. 11, p. 614-22, 1989.

HASHIMOTO, T. et al. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by β -glucans in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 19, p. 131-5, 1997.

HAUNER, D. et al. The effect of overweight and nutrition on prognosis in breast cancer. **Dtsch. Arztebl. Int.**, v. 108, n. 47, p. 795-801, 2011.

HIRATA, K. et al. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 76, p. 958-62, 1995.

HOFER, M.; POSPISIL, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice: a survey of the authors' results. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 607-9, 1997.

HUNTER, K. W.; GAULT, R. A.; BERNER, M. D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 267-71, 2002.

ICHINOE, M. et al. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. **Histopathology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 612-8, Dec. 2004.

JAISWAL, M.; LARUSSO, N. F.; GORES, G. J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 281, n. 3, p. G626-34, Sep. 2001.

JENTZCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, p. 251-6, 1996.

KANG, D. H. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. **AACN Clin. Issues**, v. 13, p. 540-9, 2002.

KAYALI, H. et al. The antioxidant effect of beta-Glucan on oxidative stress status in experimental spinal cord injury in rats. **Neurosurg Rev.**, v. 28, n. 4, p. 298-302, 2005.

KEY, T. J. et al. Diet, nutrition and prevention of cancer. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 187-200, 2004.

KIM, H. et al. Short-term satiety and glycemic response after consumption of whole grains with various amounts of beta-glucan. **Cereal Foods World**, v. 51, p. 29-33, 2006.

KIM, S. Y. et al. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. **J. Korean Med. Sci.**, v. 21, p. 781-9, 2006.

KRIZKOVA, L. et al. Fungal beta-(1-3)-d-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 3B, p. 2751-6, 2003.

KUBALA, L. et al. The effect of (1-3)- β -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, n. 24, p. 2835-40, 2003.

KUPFAHL, C.; GEGINAT, G.; HOF, H. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 686-96, 2006.

- LEE, D. Y. et al. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, p. 837-41, 2001.
- LI, L. M. et al. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. **Cancer Res.**, Chicago, v. 51, n. 10, p. 2531-5, May 1991.
- LIN, H. et al. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. **Int. Immunopharmac**, v. 4, p. 91-9, 2004.
- LJUNGMAN, A. G.; LEANDERSON, P.; TAGESSON, C. β (1-3)-d-glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 5, p. 273-81, 1998.
- LOHMAN, T. G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. **Anthropetric standardization reference manual**. Champaign, Illinois: Abridged: Human Kinetics Books, 1991. 90p.
- LUHM, J. et al. β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B,AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. **BMC Immunology**, London, v. 7, n. 1, p. 5, 2006.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. B-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 631-50, jul./set. 2008.
- MAKI, K. C. et al. Effects of consuming foods containing oat beta-glucan on blood pressure, carbohydrate metabolism and biomarkers of oxidative stress in men and women with elevated blood pressure. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 786-95, Dec. 2006.
- MANTOVANI, M. S. et al. β -Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 658, p. 154-61, 2008.
- MARLETT, J. A. Dietary fiber and cardiovascular disease. In: CHO, S. S.; DREHER, M. L. **Handbook of dietary fiber**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 17-25.
- MASON, R. What is beta-glucan? In: **SAFE goods**. [s.l.]: New Century Publishing 2000, p. 4-36.
- MATIAZI, H. J. **Otimização de extração de glucana da parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* e sua ação hipocolesterolemica e antimutagênica**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 2005.
- MEIRA, D. A. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidiodomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 496-503, 1996.
- MURTA, B. M. T. et al. The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 117, n. 2, mar. 1999.
- NAKAGAWA, Y.; OHNO, N.; MURAI, T. Suppression by *Candida albicans* h-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 710-3, 2003.

- NICOLOSI, R. et al. Plasma lipid changes after supplementation with β -glucan fiber from yeast. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, n. 2, p. 208-12, 1999.
- OHSIMA, H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 305, n. 2, p. 253-64, Mar. 1994.
- OLIVEIRA, R. J. et al. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicol In vitro**, v. 21, p. 41-52, 2006.
- OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, n. 9, p. 2181-96, 2007.
- PAQUETTE, B. et al. In vitro generation of peroxynitrite by 2- and 4-hydroxyestrogens in the presence of nitric oxide. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 14, p. 547-54, 2001.
- PETRAVIĆ-TOMINAC, V. et al. Biological effects of yeast β -glucans. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 75, n. 4, p.149-58, 2010.
- PIERCE, J. P. et al. Influence of a diet very high in vegetables, fruit and fiber and low in fat on prognosis following treatment of breast cancer. The women's healthy eating an living (WEL) randomized trial. **JAMA.**, v. 298, n. 3, p. 289-98, 2007.
- PINHO, V. F. S.; COUTINHO, E. S. F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1061-9, 2007.
- QUEENAN, K. M. et al. Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2007.
- RENTY, B. et al. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. **Cell. Biochem.**, v. 106, p. 750-7, Feb. 2009.
- REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin. Chim. Acta.**, v. 255, p. 107-17, 1996.
- REYNOLDS, J. A. et al. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. **Infect. Immun.**, v. 30, p. 51-7, 1980.
- RICE, P. J. et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **J. Pharmacol. Exp.**, v. 314, p. 1079-86, 2005.
- RIEDER, J. et al. Different patterns of inducible nitric oxide synthase gene expression in ovarian carcinoma cells lines. **Anticancer Res.**, Athens, v. 20, n. 5A, p. 3251-8, Sep./Oct. 2000.
- RIPSIN, C. M. et al. Oat products and lipid lowering: a meta-analysis. **JAMA.**, p. 267, 1992.
- ROCK, C. L.; DEMARK-WAHNEFRIED, W. Nutrition and survival after the diagnosis of breast cancer: a review of the evidence. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 15, p. 3302-16, 2002.

- ROSS, G. D. et al. Therapeutic intervention with complement and h-glucan in cancer. **Immunopharmacol**, v. 42, p. 61-74, 1999.
- RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The pathway of neoplastic transformation of human breast epithelial cells. **Radiat. Res.**, v. 155, n. 1, pt. 2, p. 151-4, 2001.
- SANDULA, J.; MACHOVÁ, E.; HRIBALOVÁ, V. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana and its water-soluble derivatives. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 17, p. 323-6, 1995.
- SENER, G. et al. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 542, n. 7, p. 170-8, 2006.
- SENER, G. et al. Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. **Inter. Immunopharmacol**, v. 5, p. 1387-96, 2005.
- SERGEEV, I. N. Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 89-90, n. 1-5, p. 419-25, 2004.
- SHI, Q. et al. Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis. **Cancer Res.**, Chicago, v. 60, n. 10, p. 2579-83, May 2000.
- SHIMIZU, C. et al. Effect of high β -glucan barley on serum cholesterol concentrations and visceral fat area in Japanese men - a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Plant Foods for Human Nutrition.**, v. 63, n. 1, p. 21-5, 2008.
- SLAMENOVÁ, D. et al. Protective effects of fungal (1-3)-beta-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Mutation Research**, v. 198, n. 20, p. 153-60, 2003.
- SLAVIN, J. L. Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, n. 3, p. 300S-307S, 2000.
- SOLÀ, R. et al. Effects of soluble fiber (*Plantago ovata* husk) on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in men with ischemic heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 4, p. 1157-63, 2007.
- SOLTYS, J.; QUINN, M. T. Modulation of endotoxin- and enterotoxin- induced cytokine release by in vitro treatment with h-(1,6)-branched h-(1,3)-glucan. **Infect Immun.**, v. 67, n. 1, p. 244-52, 1999.
- SPSS. **Statistical package for the social science for windows student version**. Versão 13.0. Chicago: SPSS Incorporation, 2000. [Software em CD-ROM]
- TAKAHASHI, H. et al. Association of immunological disorders in tethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. **Immun. Med. Microb.**, v. 31, p. 1-14, 2001.
- TALATI, R. et al. The effects of Barley-derived soluble fiber on serum lipids. **Annals of Family Medicine**, v. 7, n. 2, p. 157-63, 2009.
- TAMIR, S.; TANNENBAUM, S. R. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1288, f. 31, 1996.

THOMSON, C. A. et al. Plasma and dietary carotenoids are associated with reduced oxidative stress in women previously treated for breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 16, p. 2008-15, 2007.

TOKLU, H. Z. et al. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, p. 156-69, 2006.

TOKUNAKA, K. et al. Application of Candida solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **Internacional Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 59-67, 2002.

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. 285-7, 1996.

VETVICKA, V. Beta-glucans as immunomodulators. **Jama.**, v. 3, p. 31-4, 2003.

VETVICKA, V. et al. Pilot study: orally-administered yeast β -1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. **JAMA.**, v. 5, p. 1-6, 2002.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. Physiological effects of different types of β -glucan. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 151, n. 2, p. 225-31, 2007.

VIEIRA, F. G. K. et al. Factors associated with oxidative stress in women with breast cancer. **Nutr. Hosp.**, v. 26, n. 3, p. 528-36, 2011.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology and Behavior**, v. 94, p. 276-84, 2008.

WEITBERG, A. B. A phase I/II Trial of beta-(1,3)/(1,6) D-glucan in the treatment of patients with advanced malignancies receiving chemotherapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 40-9, 2008.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J. Immunol.**, v. 161, p. 2524-32, 1998.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. American Institute For Cancer Research. **Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective.** Washington: AICR, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry.** Geneva: [s.n.], 1995.

XIAO, Z.; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. β -Glucan enhancement of T cell IFN-gamma response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 315-20, 2004.

ZHANG, J. X. et al. Effect of oat bran on plasma cholesterol and bile acid excretion in nine subjects with ileostomies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 99-105, 1992.

7 ARTIGO 3

PERFIL NUTRICIONAL E DIETÉTICO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA, EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO, SUPLEMENTADAS COM B-GLUCANA¹.

Resumo: O interesse crescente nas β -glucanas (β G) nas últimas décadas surge das suas propriedades funcionais e bioatividade. A ingestão de β G tem sido associada à redução do risco de câncer, a redução da atividade inflamatória, da hipercolesterolemia e do peso corporal, além disso, não houve efeitos adversos relatados após o consumo de uma dieta rica em β -glucana. Nesse sentido o objetivo do estudo foi investigar o perfil nutricional e dietético de mulheres com câncer de mama suplementadas com um grama de β G. Foram analisados dados sócio-demográficos, hábitos de vida, dados antropométricos, consumo alimentar e os efeitos colaterais de 52 pacientes com câncer de mama, com idade entre 33 e 65 anos, antes e após suplementação com β G ou gelatina durante tratamento antineoplásico. A média de idade foi de $52,04 \pm 8,97$ anos, a maioria da pacientes não ingeriam bebidas alcoólicas, não eram tabagistas e não praticavam atividade física regular. Em relação aos efeitos colaterais decorrentes da quimioterapia não houve diferença entre os grupos. A avaliação nutricional das pacientes com câncer de mama indicou prevalência de sobrepeso e obesidade, risco elevado de complicações metabólicas e doença cardiovascular, entretanto não houve diferença significativa entre os resultados iniciais e finais de cada grupo. Em relação à ingestão energética, observou-se redução significativa na ingestão de gordura saturada e um aumento significativo na ingestão de gordura monoinsaturada, nos dois grupos. Os demais nutrientes avaliados não tiveram alterações com nível de significância estatística. Entretanto na avaliação do consumo de vitaminas e minerais, chama atenção o fato de que todas as vitaminas antioxidantes e o cálcio apresentaram alta prevalência de inadequação. Portanto foi possível observar que a ingestão alimentar das pacientes não estava de acordo com as recomendações dietéticas internacionais para a maioria dos nutrientes, indicando alta prevalência de inadequações de micronutrientes. Diante do exposto, se faz necessário maior atenção ao estado de saúde e a ingestão alimentar desta população.

Palavras-chave: β -glucana. Câncer de mama. Perfil nutricional. Ingestão dietética. Estresse oxidativo.

¹ Artigo científico escrito pelos autores: Clisia Mara Carreira (Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina), Edson Lavado (Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual de Londrina), José Oliveira Couto Filho (Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Estadual de Londrina), Jane Bandeira Dichi (Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Londrina), Hevenilton José Matiazi (Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina), Mário Sérgio Mantovani (Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina).

INTRODUÇÃO

Segundo a *American Cancer Association* (ACS) o diagnóstico do câncer leva a mudanças no estilo de vida; motiva a procura de informações sobre uma alimentação adequada, o uso de suplementos nutricionais e terapias alternativas (BROWN et al. 2003).

Nos últimos anos têm sido testados compostos isolados presentes em alimentos de origem vegetal como possíveis agentes anticarcinogênicos, uma vez que investigações epidemiológicas (populacionais) e experimentais (*in vivo* e *in vitro*) têm demonstrado que uma alimentação rica em ácido ascórbico, vitamina E, fitoestrógenos da soja, carotenóides, selênio, zinco, licopeno, flavonóides, e β -glucanas, podem diminuir o risco e a progressão de diversos tipos de cânceres. (FLAGG; COATES; GREENBERG, 1995; ZHANG et al., 1999; SCHRAUZER et al., 2000; FERRARI; TORRES, 2002; ROCK; DEMARKWAHNEFRIED, 2002; MANNION et al., 2011).

As β -glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia. A β -glucana da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, tem como função manter a rigidez e a forma da célula. Constitui-se de um esqueleto central linear, de moléculas de D-glicose ligadas na posição β -(1 \rightarrow 3), contendo cadeias laterais que possuem no seu interior ligações β -(1 \rightarrow 6) de tamanhos variados e que ocorrem em diferentes intervalos ao longo do esqueleto central. A localização deste polissacarídeo se faz na camada intermediária da parede celular de leveduras a qual é adjacente à membrana plasmática (SANDULA et al., 1995; GARDINER, 2000).

Diversas pesquisas têm avaliado a associação da dieta com o desenvolvimento e a progressão do câncer de mama (DIVISI et al., 2006; DONALDSON, 2004; KEY et al., 2003). Tais estudos objetivam esclarecer quais constituintes da dieta podem desempenhar papel protetor ou determinante em relação ao câncer de mama, bem como os mecanismos pelos quais os nutrientes podem estar envolvidos na progressão, recidiva e mortalidade decorrente da doença.

Ainda que sejam observadas inconsistências e que a interpretação dos dados sobre dieta e câncer de mama seja contraditória, é evidente que os hábitos alimentares estão diretamente relacionados com maior ou menor ocorrência de câncer, o que estimula a continuidade dos estudos. Em outros casos, ainda se faz necessário testar substâncias

extraídas de alguns alimentos como é o caso das β -glucanas que possui indícios de ação efetiva na prevenção e no desenvolvimento do câncer.

Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o perfil nutricional e dietético de mulheres com câncer de mama, em tratamento quimioterápico, suplementadas com β -glucana.

Participantes e Métodos

Sujeitos

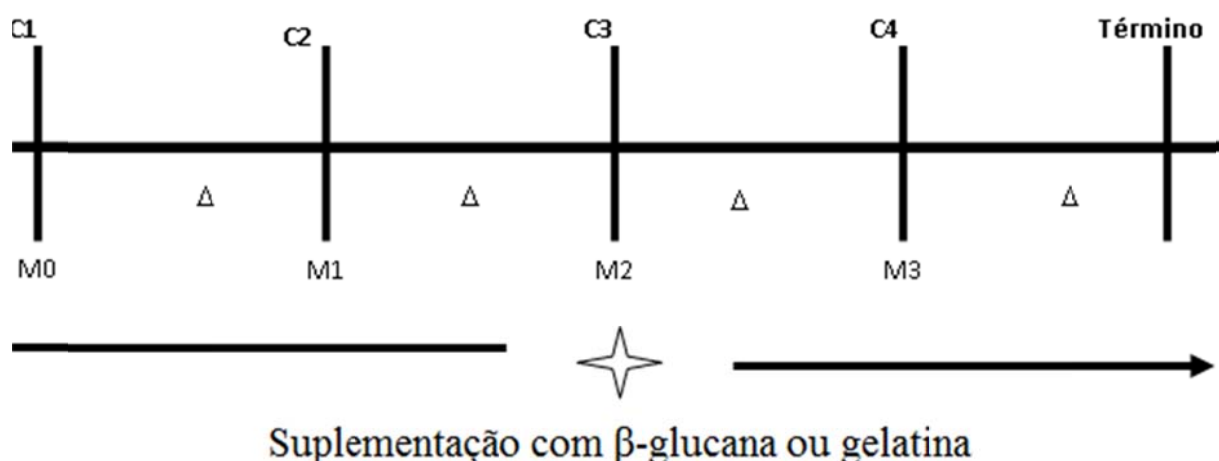
Participaram do estudo mulheres com câncer de mama, atendidas no ambulatório do Instituto de Câncer de Londrina (ICL), Estado do Paraná, no período de 2008 a 2010, submetidas a tratamento clínico e quimioterápico adjuvante. Como critérios de inclusão foram considerados: mulheres com diagnóstico de câncer de mama confirmado e que foram submetidas à quimioterapia, tendo entre dezoito e sessenta e cinco anos. Foram excluídas as mulheres em estadiamento IV da doença e as que apresentaram outras patologias crônicas, distúrbios hormonais e os indivíduos do sexo masculino (Figura 1). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina sob o número: 006/07 (Anexo A).

Em relação ao estadiamento clínico, a neoplasia de mama foi classificada de acordo com o tamanho do tumor, acometimento de linfonodos regionais e metástase à distância, em estágios: 0, I, II, III e IV (INCA, 2004).

Protocolo Experimental

Trata-se de um ensaio clínico controlado aleatório duplo cego, com duas intervenções paralelas. Para homogeneizar a amostra todas as pacientes receberam a suplementação por um período de 84 dias. Foram realizados três encontros para coleta de sangue, avaliação nutricional, fornecimento das cápsulas e investigação de efeitos colaterais (Figura 1). As pacientes foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: β -glucana (intervenção) composto por 25 pacientes, que receberam a suplementação oral de um grama de β -glucana, em cápsulas, e o grupo controle constituído por 27 pacientes, que receberam a mesma quantidade de gelatina em cápsulas.

Figura 1 - Esquema de acompanhamentos das pacientes durante o ensaio clínico



Legenda: Δ período entre tratamentos 21 dias; C1, C2, C3, C4: Ciclos de Quimioterapia (QT); M0 – entrevista inicial; assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, avaliação nutricional e entrega das cápsulas de suplementação. M1, M2, M3 – Retorno com a nutricionista para a reposição das cápsulas, avaliação nutricional e pesquisa sobre efeitos colaterais. M4 – Entrevista final: avaliação nutricional, pesquisa sobre efeitos colaterais e orientações gerais.

Durante a avaliação nutricional as pacientes receberam todas as orientações necessárias em relação à suplementação e levaram os frascos contendo as cápsulas com β-glucana ou com gelatina, foram orientadas a ingerir duas cápsulas por dia, totalizando um grama de suplemento. Também foram orientadas a não modificarem sua dieta habitual e não ingerirem outros suplementos nutricionais durante o desenvolvimento do estudo. A β-glucana utilizada apresentava pureza de 87,6%, conforme descrito por Matiazi (2005), sendo fornecida pelo próprio pesquisador. A gelatina em pó foi adquirida da Galena Química e Farmacêutica LTDA, Campinas, SP, Brasil e o encapsulamento das substâncias foram realizados no Laboratório de Produção de Medicamentos da UEL, pela própria pesquisadora.

Parâmetros avaliados

Os dados do perfil sócio-econômico, história clínica e os hábitos de vida foram obtidos por meio dos prontuários médicos e da entrevista inicial com as pacientes, utilizando o formulário apresentado no Anexo B.

Em relação à avaliação antropométricas foram avaliadas as seguintes medidas: peso, altura, circunferência da cintura, circunferência braquial, dobras cutâneas (bicipital, tricípital, subescapular e supra-íliaca) para a realização dos cálculos do IMC, percentual de gordura corporal e análise da circunferência da cintura como indicador de risco cardiovascular. As medidas antropométricas realizadas foram obtidas pelo mesmo avaliador,

experiente e treinado. Cada paciente teve duas avaliações, uma antes da suplementação (inicial) e outra após o término da suplementação (final).

O diagnóstico do estado nutricional foi realizado por meio do IMC, e classificado de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995). Para a avaliação da circunferência da cintura, utilizou-se a classificação proposta pelo NCEP-ATPIII (2001), que considera para mulheres valores ≥ 88 cm como risco elevado de complicações metabólicas associadas à obesidade e valores < 88 cm, sem risco. Em relação à classificação da porcentagem de gordura corporal seguiu-se o critério proposto por LOHMAN et al (1991) que considera risco de doenças associadas à obesidade o percentual de gordura corporal ≥ 32 .

Considerando a complexidade dos determinantes da alimentação cotidiana, a escolha da técnica adequada para avaliar o consumo alimentar apresenta alto grau de dificuldade, pois todas têm suas limitações e estas podem mascarar os resultados. A avaliação da alimentação das pacientes foi realizada por meio do Inquérito Recordatório Alimentar de 24 horas (IR24h) (GIBSON, 1990). A partir desse inquérito foi possível obter informações sobre a alimentação das pacientes durante as últimas 24 horas que antecederam a entrevista. As informações foram obtidas em medidas caseiras com auxílio de um registro fotográfico (ZABOTTO; VIANA; GIL, 1996).

Os recordatórios alimentares foram realizados em dois momentos, na entrevista inicial e no final do período de suplementação (84 dias). Os dados foram coletados as terças ou quarta-feiras, evitando-se os finais de semana e dias após o fim de semana e feriados.

As informações alimentares coletadas pelos IR24h estavam em medidas caseiras e foram transformadas em gramas ou mililitros para serem adicionadas ao programa, para isso foi utilizado como referências às tabelas de alimentos (PINHEIRO et al 2001), Os cálculos dietéticos foram realizados com auxílio do programa Nutwin® v.1.5 profissional (UNIFESP, 2002) e foram analisados os macronutrientes, fibras, micronutrientes e ingestão energética total.

Cabe destacar que foi orientado as pacientes manterem seu padrão alimentar durante a realização pesquisa, para que não houvesse interferência no resultado da suplementação. Após o período da intervenção, todas as pacientes foram convidadas a retornarem para receber os resultados da pesquisa e também as orientações nutricionais necessárias.

Análise da Ingestão dos Nutrientes

A análise da ingestão dos macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) foi obtida a partir do cálculo dos três IR24h de cada paciente. A distribuição percentual de macronutrientes utilizada foi proposta pelo Food na Nutrition board to Institute of Medicine, para população saudável, dividida em faixas de distribuição, sendo que para os carboidratos a recomendação aceitável é de 45 – 65%, proteínas de 10 – 35% e Gordura total de 20 – 35% (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002).

Para avaliação da adequação da ingestão individual de fibras e de micronutrientes, foram utilizadas as recomendações da Dietary Reference Intakes (DRI), usando como referência as EAR (*Estimated Average Requirement*). Quando o nutriente não tem EAR foi utilizado as AIs (*Adequate Intake*), ressaltando que não é possível assumir os valores de AI como estimativa das necessidades, mas sim como ingestão recomendada (FOOD NUTRITION BOARD OF INTITUTE OF MEDICINE, 2000, 2001, 2006). Foram analisadas as seguintes variáveis: energia, proteínas, carboidratos, gordura total, ácidos graxos saturados, ácidos graxos poliinsaturados, ácidos graxos monoinsaturados, colesterol, fibras, vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina B12, cálcio, ferro, zinco e cobre.

Quanto à avaliação da adequação da ingestão individual é possível estimar a probabilidade de concluir corretamente a adequação da ingestão de um indivíduo, observando-se a diferença entre a ingestão e a mediana da necessidade. Quando o consumo habitual for abaixo do EAR, indica grande probabilidade de inadequação.

RESULTADOS

A idade média das 52 pacientes acompanhadas foi de $52,04 \pm 8,97$ anos, sendo a mais nova com 33 anos e a mais velha com 65 anos. A renda familiar média foi de R\$ $725,50 \pm 457,65$ reais, superior a um (1) salário mínimo (SM) do Estado do Paraná. A descrição dos estadiamentos clínicos da doença de cada paciente, as características sócio-demográficas e os hábitos de vida estão demonstrados na Tabela 1.

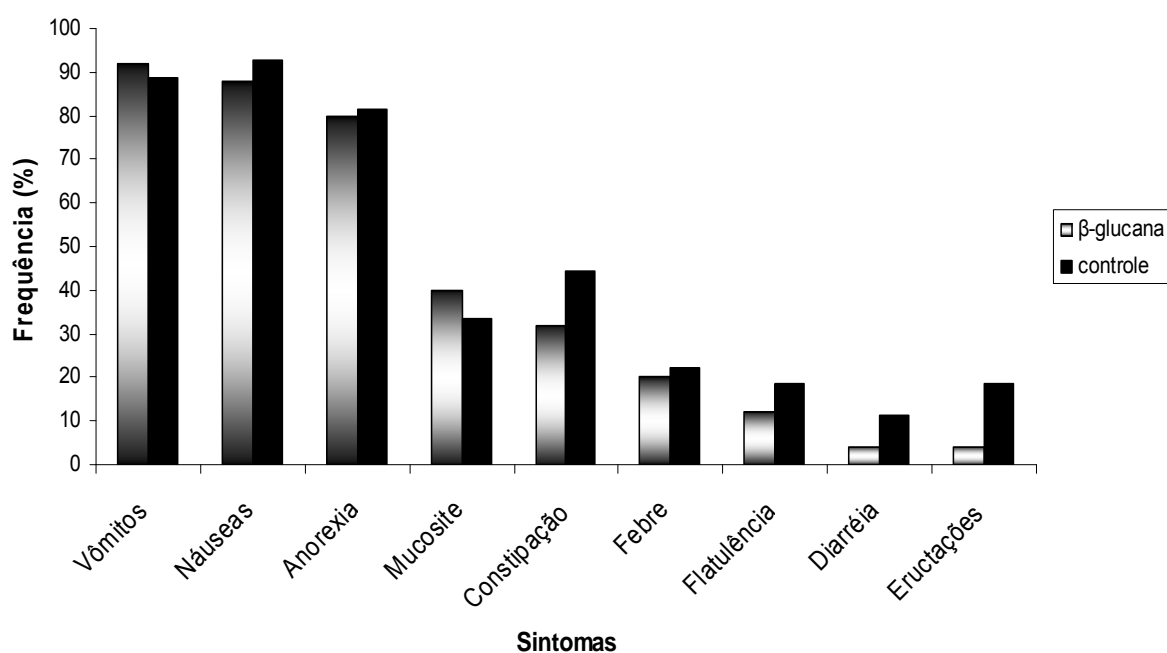
Tabela 1 - Distribuição percentual das características sócio-demográficas, estadiamento clínico e hábitos de vida das mulheres com câncer de mama, de acordo com o grupo de estudo, Londrina, 2008-2010.

Variáveis	Categorias	Grupo β -glucana n = 25		Grupo controle n = 27		*p-valor
		N	%	N	%	
Grupo etário (anos)	20 - 39	2	8	2	7	0,88
	40 - 59	16	64	16	59	
	60 - 65	7	28	9	34	
Renda Familiar	Até 1 SM	14	56	15	55,6	0,87
	1-3 SM	9	36	12	44,4	
	> 3 SM	2	8	0		
Estadiamento Clínico	I	3	12	1	3,7	0,43
	II	16	64	13	48,1	
	III	6	24	13	48,1	
Consumo de bebida alcoólica > 2x/semana	Não	22	88	26	96,3	0,74
	Sim	3	12	1	3,7	
Tabagismo	Não	21	84	22	81,5	0,98
	Sim	4	16	5	18,5	
Prática de Atividade Física	Não	22	88	23	85,2	0,92
	Sim	3	12	4	14,8	

Legenda: *p-valor: nível de significância de ($p < 0,05$).

Em relação aos efeitos colaterais relatados decorrentes da quimioterapia, verificou-se que as pacientes que receberam β -glucana, por 84 dias, apresentaram menor percentual de queixas, para a maioria dos sintomas, em relação ao grupo controle, entretanto essa diferença não foi significativa (Figura 2).

Figura 2 - Frequência dos sintomas relatados pelas pacientes, dos dois grupos de estudos, Londrina, 2008-2010



A avaliação nutricional das pacientes realizada antes e após a intervenção, considerando os parâmetros IMC, circunferência da cintura e porcentagem de gordura corporal, está descrita na Tabela 2.

O IMC médio do grupo β -glucana foi de $25,36 \pm 4,27$ kg/m² e do grupo controle foi de $26,05 \pm 4,73$ kg/m² que corresponde ao estado nutricional de sobrepeso.

Os parâmetros utilizados para a avaliação nutricional das 52 pacientes com câncer de mama caracterizaram prevalência de sobrepeso e obesidade, com risco elevado de complicações metabólicas e doença cardiovascular, entretanto não houve diferença significativa na comparação dos resultados iniciais e finais e entre os grupos.

Tabela 2 - Distribuição percentual do IMC, circunferência da cintura e % gordura corporal das mulheres com câncer de mama, antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010

Variáveis	Classificação	Grupo β -glucana n = 25					Grupo controle n =27				
		Basal		Final		p-valor*	Basal		Final		p-Valor*
		n	%	n	%		n	%	n	%	
IMC (kg/m ²)	Desnutrido (<18,5)	01	4,0	01	4,0	1,0	01	3,7	00	0,0	0,93
	Eutrófico (18,5 - 24,9)	09	36,0	09	36,0	1,0	06	22,22	07	25,92	0,76
	Sobrepeso (25 - 29,9)	10	40,0	10	40,0	1,0	11	40,74	10	37,4	0,45
	Obeso (≥ 30)	05	20,0	05	20,0	1,0	09	33,33	10	37,4	0,54
Circunf. da Cintura (cm)	Baixo risco (< 88)	16	64,0	15	60	0,94	15	55,55	12	44,45	0,68
	Alto risco (≥ 88)	09	36,0	10	40	0,88	12	44,45	15	55,55	0,54
Gordura Corporal (%)	Acima da média (24 - 31)	02	8,0	0	0,0	0,64	03	11,10	00	0,0	0,47
	Risco de obesidade (≥ 32)	23	92,0	25	100	0,49	24	88,9	27	100	0,40

Legenda: * p-valor: nível de significância de ($p < 0,05$).

A análise do consumo alimentar das pacientes está descrita nas Tabelas 3, 4 e 5. A ingestão média de macronutrientes, fibras e do colesterol dietético (Tabela 3), revelou redução significativa no consumo de gordura saturada e aumento no consumo de alimentos fontes de ácido graxos monoinsaturados nos dois grupos estudados. A ingestão energética e os demais nutrientes não apresentaram alterações significativas.

Os valores da mediana e quartis da ingestão dos micronutrientes estão descritos na tabela 4 e a prevalência de inadequação na tabela 5. A análise da ingestão inicial e final dos micronutrientes e a comparação entre os grupos, não indicou diferença significativa. Entretanto a avaliação da prevalência de inadequação do consumo de vitaminas e minerais, chama atenção o fato de que todas as vitaminas avaliadas apresentaram alta

prevalência de inadequação com destaque para a vitamina E (96 e 100%) nos dois grupos respectivamente.

Não foi possível estimar a prevalência de inadequação do consumo de cálcio pelo fato desse nutriente não possuir EAR, entretanto quando confrontado a média de ingestão do cálcio com o valor de AI, apenas cinco (20%) pacientes do grupo β -glucana e seis (22,22%) do grupo controle ingeriam 1200 mg de cálcio ou mais por dia, indicando que possivelmente o consumo desse nutriente seja inadequado.

Tabela 3 - Valores da mediana e quartis da ingestão energética e dos nutrientes das pacientes com câncer de mama antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010.

Nutrientes		Grupo β -glucana n = 25			Grupo controle n =27		p-valor*
		Basal	Final	P-valor*	Basal	Final	
Ingestão energética (Kcal)	Mediana	1520,96	1591,04	0,527	1435,7	1455,59	0,638
	1°- 3° quartil	1153,94 - 2013,68	1187,46-103,08		1113,93-1669,8	1125,27-1936,53	
Carboidrato (g)	Mediana	210,74	221,41	0,989	175,44	214,84	0,191
	1°- 3° quartil	155,99 - 292,46	163,41-285,39		134,1-222,23	166,7-271,54	
Proteína (g)	Mediana	78,17	78,17	0,201	73,53	58,14	0,424
	1°- 3° quartil	59,62 - 95,66	61,83-100,79		59,94-92,49	50,52-92,85	
Fibra (g)	Mediana	17,01	17,3	0,778	16,49	17,54	0,381
	1°- 3° quartil	12,73-27,04	10,83-26,75		8,76-21,89	9,77-21,38	
Colesterol Dietético (mg)	Mediana	197,54	179,35	0,716	141,25	156,47	0,280
	1°- 3° quartil	147,2-256,15	114,63-256		90,08-262,59	123,3-259,25	
Gordura total (g)	Mediana	41,66	39,74	0,527	38,97	41,8	0,316
	1°- 3° quartil	29,07-50,49	28,99-49,96		32,83-48,21	26,8-57,74	
Gordura Saturada (g)	Mediana	20,5	9,7	<0,001	18	10,4	0,005
	1°- 3° quartil	14,65-25,75	6,7-12,8		10,63-24,15	5,93-17,58	
Gordura Polinsat. (g)	Mediana	6,29	6,02	0,346	5,42	4,54	0,144
	1°- 3° quartil	3,73-8,11	3,12-10,68		3,59-6,58	3,03-5,59	
Gordura monoins. (g)	Mediana	16,42	18,26	0,037	15,01	18,99	<0,001
	1°- 3° quartil	12,99-19,47	14,82-27,98		11,34-17,56	16,77-22,79	

Tabela: *p-valor: nível de significância estatística ($p < 0,05$) em negrito.

Tabela 4 - Valores da mediana e quartis da ingestão de retinol, ácido ascórbico, cianocobalamina, tocoferol, cálcio, ferro, zinco e cobre das pacientes com câncer de mama antes e após a suplementação, Londrina, 2008-2010

Micronutrientes	Grupo β -glucana n = 25			Grupo controle n =27		
	Basal Md (1°- 3° q)	Final Md (1°- 3° q)	p-valor**	Basal Md (1°- 3° q)	Final Md (1°- 3° q)	p-valor**
Vitamina A* (RAE)	1046 (293,13- 578,8)	1368,98 (452,99-3178,67)	0,367	486,45 (215,39-1888,77)	936,4 (320,31-1662,55)	0,424
Vitamina C* (mg)	22,83 (11-151,31)	44,44 (12,98-97,29)	0,563	40,12 (9,11-273,66)	90,61 (26,1-203,42)	0,732
Vitamina B12* (μ g)	1,85 (1,03-4,39)	2,33 (1,24-4,94)	0,109	1,7 (1,16-4,36)	2,23 (1,25-4,45)	0,675
Vitamina E* (mg)	2,54 (1,24-4,36)	2,19 (1,14-4,78)	0,253	1,95 (1,22-4,76)	2,16 (1,23-3,64)	0,861
Cálcio † (mg)	673,76 (356,68-940,98)	668,62 (411,38-1111,42)	0,757	569,97 (394,64-994,88)	584,44 (460,04-1016,36)	0,118
Ferro* (mg)	14,86 (9,83-20,63)	13,02 (7,48-30,56)	0,861	13,15 (10,3-17,97)	13,02 (10,3-20,2)	0,675
Selênio* (μ g)	40,5 (22,62 – 65,3)	42,8 (21,98-68,7)	0,658	41,7 (22,34-67,2)	42,3 (21,87-67,9)	0,926
Zinco* (mg)	12,66 (7,86-18,52)	12,07 (7,79-20,48)	0,306	10,7 (6,53-13,69)	10,2 (7,19-20,8)	0,151

Legenda: RAE: equivalente de atividade de retinol; * EAR (Estimated Average Requirement); † AI (Adequate intake); **p-valor: nível de significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Prevalência de inadequação da ingestão de retinol, ácido ascórbico, cianocobalamina, tocoferol, cálcio, ferro, zinco e cobre das pacientes com câncer de mama de acordo com os grupos de estudo, Londrina, 2008-2010.

NUTRIENTES	RECOMENDAÇÃO	Grupo β -glucana n = 25		Grupo controle n =27	
		n	%	n	%
Vitamina A* (RAE)	500 μ g	10	40	9	33,33
Vitamina C* (mg)	60 mg	15	60	13	48,15
Vitamina B12* (μ g)	2,4 μ g	13	52	17	62,96
Vitamina E* (mg)	12 mg	24	96	27	100
Cálcio † (mg)	1200 mg	19	76	24	88,89
Ferro* (mg)	5 mg	2	08	2	7,40
Selênio* (μ g)	45 μ g	5	20	4	14,81
Zinco* (mg)	6,8 mg	3	12	6	22,22

Legenda: RAE: equivalente de atividade de retinol; * EAR (Estimated Average Requirement); † AI (Adequate intake).

DISCUSSÃO

A orientação dietética durante o tratamento, também chamada de aconselhamento nutricional, é recomendada para a prevenção da perda de peso durante a quimioterapia, além de prevenir interrupções na alimentação quando associada à radioterapia (ARENDS et al., 2006). É um método simples, não invasivo e eficaz para prevenção e controle dos efeitos adversos (MEYENFELDT, 2005). Segundo Trintin (2003), o tratamento

antineoplásico está associado a alterações no estado nutricional de pacientes com câncer, uma vez que pode desencadear modificações no peso e na composição corporal, alterações no consumo alimentar e desenvolvimento de aversões alimentares, resultando em alterações na qualidade de vida. Além disso, dados encontrados na literatura referem que uma grande parcela das mulheres procura alternativas alimentares mais saudáveis após o diagnóstico da doença como forma de prevenção à recorrência ou ao surgimento de novos tumores (MASKARINEC et al., 2001; MAUNSELL et al., 2002; SALMINEN et al., 2002; THOMSON et al., 2002).

Em relação às características sócio-demográficas, estadiamento clínico e hábitos de vida das mulheres com câncer de mama estudadas, observamos que nossa amostra foi homogênea entre os grupos de estudo. Dentre os indicadores de hábitos de vida avaliados, identificamos baixo consumo de bebida alcoólica e tabagismo e alta prevalência de sedentarismo.

A análise dos efeitos colaterais relacionados com o tratamento quimioterápico não apresentou diferença entre os grupos. Os sintomas mais relatados pelas pacientes foram: náuseas, vômitos e inapetência. Segundo Beteretche et al. (2004) esses sintomas são muito comuns em pacientes em tratamento quimioterápico, sendo responsáveis por alterações nos hábitos alimentares, conhecidas como aversões alimentares adquiridas. Sendo assim é possível que a alteração da ingestão alimentar esteja relacionada aos efeitos colaterais (MALZYNER; CAMPONERO, 2004).

Para avaliar o perfil nutricional das mulheres com câncer de mama, foi realizado avaliação das medidas antropométrica antes e após a suplementação. Alguns estudos mostraram uma relação direta entre obesidade e incidência de câncer de mama em fase pré-menopausal. Além disso, o ganho de peso, após o diagnóstico da doença, pode afetar a sobrevivência das pacientes, e está relacionado ao aumento na progressão do tumor e nas taxas de mortalidade associadas à neoplasia mamária (BERGSTROM et al., 2001).

O diagnóstico nutricional foi obtido pela classificação do IMC, proposta pela OMS, (1995), complementado com a circunferência da cintura e % de gordura corporal. Em relação ao IMC, 40,4% das pacientes com câncer de mama apresentou diagnóstico de sobrepeso e 26,9% de obesidade antes do início do tratamento quimioterápico e da suplementação. Os outros parâmetros utilizados indicaram presença de obesidade e risco elevado de complicações metabólicas e doença cardiovascular, mas não houve diferença significativa inicial e final e entre os grupos, sugerindo que a β -glucana não interferiu no diagnóstico nutricional das pacientes com câncer de mama.

Entretanto observou-se que o IMC médio das pacientes não esteve de acordo com as recomendações oficiais contidas no relatório de perspectiva global sobre alimentos, nutrição e prevenção do câncer, em nenhuma das etapas da pesquisa, uma vez que a recomendação de IMC para prevenção de câncer de mama é entre 18,5-24,9 kg/m², com mediana indicada de 21 a 23 kg/m² (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007).

Nos últimos anos o sobrepeso e a obesidade têm sido cada vez mais relacionados ao câncer de mama principalmente em mulheres na pós-menopausa (DIETZ et al., 1997; HALL et al., 2000; LOI et al., 2005; TAO et al., 2006). No estudo de Pierce et al. (2007) foram avaliados 1490 mulheres com câncer de mama e constataram que o IMC foi relacionado positivamente com o índice de mortalidade, indicando que as mulheres com IMC ≥ 30 kg/m² apresentaram taxa de mortalidade mais elevada em relação aquelas com peso adequado.

Para complementar a avaliação nutricional das pacientes com câncer de mama, foi analisado o consumo alimentar antes e após o tratamento quimioterápico, de acordo com o grupo de estudo. A análise nutricional consistiu em investigar a ingestão média de macronutrientes, micronutrientes e das fibras alimentares e verificar se a ingestão estava de acordo com as recomendações propostas pelo Institute of Medicine (1999; 2000; 2002; 2006).

Nossos resultados mostraram que as pacientes com câncer de mama antes do início do tratamento quimioterápico apresentaram uma ingestão energética total média de 1477,5 Kcal/dia, enquanto que a recomendação energética média para a faixa etária entre 51 e 70 anos é de 2172 kcal/dia. Possivelmente essa diferença de consumo energético pode ser explicada pelo sub-relato de ingestão alimentar, que é um problema comum em inquéritos alimentares e pode ser composto do sub-registro e/ou do subconsumo. O sub-registro é o não relato de alimentos consumidos, enquanto que o subconsumo é a diminuição do alimento relatado pelo paciente durante a entrevista (GORIS et al., 2000).

Em relação aos macronutrientes, a literatura aponta que diferentes tipos de gordura como ácidos graxos saturados, insaturados, poliinsaturados e trans, têm sido relacionados com o câncer de mama (JAKOVLJEVIC et al., 2002). Alguns estudos (ROGERS, 1997; BARTSCH; NAIR; OWEN, 1999) mostram que vários passos do processo tumorigênico, incluindo iniciação, promoção, latência, crescimento e metástases, podem ser influenciados pelo tipo de gordura da dieta.

No entanto, o tipo de ácido graxo da dieta parece ser mais importante do que a quantidade total de gordura consumida. Dentro desse contexto, os ácidos graxos saturados, ácidos graxos poliinsaturados (AGP) da família n-6 e uma alta relação AGP n-6/n-3 parecem

estar relacionados ao maior risco de desenvolvimento do câncer de mama. Enquanto que os ácidos graxos monoinsaturados e os AGP da família n-3 parecem exercer um papel de proteção ao risco de câncer de mama (KUSHI; GIOVANNUCCI, 2002).

Nossos resultados mostraram que as pacientes dos dois grupos, apresentaram redução significativa na ingestão de gordura saturada e aumento significativo na ingestão de ácidos graxos monoinsaturados após a intervenção. Holm et al (1993) verificaram que o consumo de gordura saturada esteve, positivamente, associado com recorrência de câncer de mama ou surgimento de outro tipo de câncer. Zhang et al (1995) constataram relação inversa entre consumo de gordura saturada e tempo de sobrevivência em mulheres com neoplasia mamária. Na metanálise de Boyd et al (2003) foi demonstrado um aumento de 19% no risco de câncer de mama em mulheres com alto consumo de gordura saturada. Entretanto segundo a revisão de Michels et al (2007) realizada em Boston nos Estados Unidos, com análise de 108 artigos, entre estudos de coorte, caso-controle e metanálise, a ingestão de gordura não teve relação direta com a incidência de câncer de mama na maioria dos estudos.

A redução no consumo de gordura saturada foi um resultado positivo, uma vez que não era objetivo do estudo modificar a dieta habitual das pacientes. Existem alguns estudos recentes que apresentam dados sobre a mudança de hábitos alimentares após diagnóstico de câncer de mama (MAUNSELL et al., 2002; THOMSON et al., 2002; PATTERSON et al., 2003). Em estudo realizado no Canadá, com 250 mulheres, ao questionar se elas haviam mudado sua alimentação desde o diagnóstico, obteve-se, como resultado, que 41% relataram ter mudado sua dieta (MAUNSELL et al., 2002). As alterações mais comuns foram: diminuição no consumo de alimentos gordurosos e aumento no consumo de fibras (frutas e verduras). No estudo realizado nos Estados Unidos, com 3.084 mulheres que foram tratadas na fase inicial do câncer de mama e não tiveram recorrência da doença, foi demonstrado que 80% das mulheres com câncer de mama registraram uma diminuição do consumo de gordura desde o diagnóstico (THOMSON et al., 2002).

O aumento significativo na ingestão de ácido graxo monoinsaturado (AGM) também foi um resultado positivo, uma vez que algumas evidências sugerem que o óleo de oliva e outras fontes de ácidos graxos monoinsaturados podem, modestamente, diminuir o risco de câncer de mama (KUSHI; GIOVANNUCCI, 2002). Na Itália e na Espanha, onde o óleo de oliva é a principal fonte de ácido oléico da dieta, a incidência de câncer de mama é menor que na América do Norte e nordeste da Europa. Contudo os estudos em relação ao AGM ainda são controversos, alguns autores encontraram associação positiva com o câncer

de mama (133), entretanto, a maioria não encontrou a mesma associação (MARTIN-MORENO et al., 1994; LA VECCHIA; FAVERO; FRANCESCHI, 1998; KLEIN et al., 2000). Existe a hipótese de que a proteção contra o câncer esteja associada à elevada quantidade de antioxidantes presentes no óleo de oliva, portanto esse efeito protetor precisa ser mais bem investigado.

Outro aspecto importante de proteção contra o câncer é o consumo de fibras alimentares, que segundo a Organização Mundial da Saúde, deve ser de pelo menos, 400 gramas de frutas e hortaliças sem amido por dia, essa é a estratégia preventiva contra o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, inclusive câncer (OMS, 2002).

A ingestão média de fibras das pacientes estudadas foi menor que a recomendação (25-30g/dia), nos dois grupos. Esses achados indicam que as pacientes com câncer de mama já apresentavam um baixo consumo de fibras alimentares mesmo antes do diagnóstico da doença.

Entre os micronutrientes mais investigados por sua atuação quimiopreventiva na carcinogênese mamária estão as vitaminas antioxidantes, selênio e zinco (WILLETT, 2000; WILLETT, 2001; LESPÉRANCE et al., 2002). Um dos mecanismos de ação desses micronutrientes é a defesa contra as espécies reativas de oxigênio (Eros), que são responsáveis por danos no DNA, regulação da diferenciação celular e, conseqüentemente, inibição do crescimento de células mamárias cancerígenas (WILLETT 2001). Nesse sentido, um dos objetivos do estudo foi analisar o consumo alimentar desses micronutrientes, antes e após o período de quimioterapia.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos em relação à ingestão de vitamina A, vitamina E, vitamina C, vitamina B12, cálcio, ferro, selênio e zinco. Esses resultados revelaram que as pacientes apresentavam inadequação na ingestão alimentar, uma vez que não foi proposto modificação na dieta habitual. A comparação da ingestão média desses nutrientes com a ingestão recomendada foi realizada para verificar a prevalência de inadequação. Os resultados chamam-se atenção, para o fato de que todas as vitaminas avaliadas apresentaram alta prevalência de inadequação, ou seja, a maioria das pacientes não ingeria a quantidade diária recomendada de vitaminas, favorecendo as deficiências nutricionais e redução das defesas antioxidantes.

A vitamina A foi a primeira vitamina lipossolúvel a ser reconhecida e o betacaroteno é o carotenóide com maior poder de formação dessa vitamina, encontrado na natureza, mas em relação à redução do risco de câncer da mama, os resultados são inconsistentes (MUINDI, 1996; DUNCAN, 2004). No estudo Physicians' Health Study (PHS)

(HENNEKENS et al., 1996) realizado com 22071 médicos que foram acompanhados por 12 anos, não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu suplementação de β -caroteno (50 mg em dias alternados) e o grupo placebo, em relação à incidência de câncer ou mortalidade por todas as causas (HENNEKENS et al., 1996). Outro importante estudo β -carotene Retinol Efficacy Trial (CARET), por sua vez, investigou o efeito da suplementação conjunta de β -caroteno (30 mg/dia) e vitamina A (25 000 U) em uma população de alto risco para câncer de pulmão (fumantes e trabalhadores expostos ao asbesto), por um período de cerca de cinco anos (OMENN et al., 1996). Este estudo foi interrompido 21 meses antes do término, uma vez que foi constatado, no grupo suplementado, um aumento na incidência de morte por qualquer causa, incluindo câncer de pulmão.

Por outro lado, sua ação parece ser reconhecida bloqueando a fase inicial e a promoção da gênese do tumor mamário, atuando na regulação da diferenciação celular e prevenindo aumento de células com características de malignidade (STOLL, 1998; BLOCK, 2004). Sendo assim é importante preconizar as fontes alimentares naturais desse antioxidante (cenoura, abóbora, espinafre, tomate) para garantir a recomendação de 500 μ g de acordo com a EAR.

A vitamina E também é um potente antioxidante, sendo reconhecida por reduzir a incidência de tumores mamários induzidos experimentalmente. O α -tocoferol representa a forma da vitamina E com maior poder antioxidante e amplamente distribuída no organismo, apresentando uma importante proteção contra a per oxidação lipídica nas membranas celulares (STAHL et al., 1997). Entretanto, não há um consenso entre os estudos experimentais e epidemiológicos, sobre a suplementação dessa vitamina no câncer de mama.

No estudo realizado em Linxian (China) (BLOT et al., 1993), a suplementação conjunta de vitamina E, β -caroteno e selênio foi benéfica para indivíduos de populações com baixo consumo de micronutrientes e com concentrações plasmáticas reduzidas de carotenóides. Assim, observou-se uma redução de 21% na mortalidade por câncer de estômago e de 9% na mortalidade total. Entretanto no estudo Alpha-Tocopherol, β -Carotene Cancer Prevention Study (ATBC), os tabagistas finlandeses que receberam β -caroteno (20 mg/dia) e β -caroteno mais vitamina E (50 mg/dia) não responderam positivamente à suplementação; ao contrário, constatou-se nesses indivíduos um aumento de 18% na incidência de câncer de pulmão e de 8% na mortalidade total.

No entanto existe uma preocupação com a baixa ingestão diária da vitamina E, nossos resultados mostraram prevalência de inadequação de 96% para as pacientes do grupo β -glucana e de 100% para o grupo controle, ou seja, praticamente todas as pacientes

com câncer de mama não ingeriam fontes alimentares de vitamina E (azeite, cereais integrais e oleaginosas) suficientes para atender a recomendação de 12 mg/dia. Nesse caso se faz necessário priorizar o consumo dessa fonte para pacientes com câncer de mama.

A vitamina C (ácido ascórbico) é considerada um antioxidante capaz de proteger completamente os lipídios do dano de per oxidação induzido pelos radicais peroxil (PAN et al ., 2011). Seu possível mecanismo de ação como bloqueador da carcinogênese mamária está baseado na defesa antioxidante (WILLETT, 2001). No entanto, os dados de estudos científicos são poucos e controversos, porém uma metanálise que avaliou o risco relativo de câncer de mama em 26 publicações, de 1982 a 1997, evidenciou uma relação inversa entre o consumo de vitamina C e risco relativo deste tipo de neoplasia (RR= 0,80; IC95% 0,68-0,95; p=0,02) (GANDINI et al., 2000).

Com relação à deficiência na ingestão de Vitamina C, um estudo caso-controle (LAMSON; BRIGNALL, 1999) observou por meio do recordatório alimentar de 24h, que 29% dos casos e 3% do controle tiveram consumo menor que 50% da recomendação diária de vitamina C (60 mg), nossos resultados mostraram que 24 pacientes (46,15%) tiveram consumo de vitamina C inadequado, nesse caso se faz necessário acrescentar na alimentação habitual dessas pacientes, alimentos fontes como: frutas cítricas e verduras frescas.

Frente ao exposto, a ingestão de quantidades fisiológicas de antioxidantes, tais como as vitaminas E, C e os carotenóides, pode retardar ou prevenir o aparecimento de câncer (ZHANG et al., 1999), desde que, sejam consumidos por meio de uma dieta rica em frutas e hortaliças, contendo quantidades de antioxidantes, próximas às recomendadas nutricionalmente. O aporte de quantidades mais elevadas, na forma de suplementos, não está indicado, podendo inclusive ser deletério para o organismo, conforme constatado nos estudos.

Desta forma, acredita-se que a orientação em relação a uma dieta equilibrada e rica em nutrientes antioxidantes que resulte na manutenção do peso adequado, pode refletir, positivamente, na eficácia do tratamento antineoplásico, como também na redução dos danos oxidativos e fisiológicos resultantes da terapêutica antineoplásica. Percebemos que as pacientes sobreviventes ao câncer demonstram grande motivação para receber informações sobre alterações dietéticas e terapias nutricionais complementares relacionadas à melhoria do seu tratamento, redução no risco de recorrência e melhora da qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN HEART ASSOCIATION. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, p. 2486-97, 2001.
- ARENDS, J. et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: nonsurgical oncology. **Clin. Nutr.**, v. 25, p. 245-59, 2006.
- BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R. W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectal: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 12, p. 2209-18, 1999.
- BERGSTROM, A. et al. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. **Int. J. Cancer**, v. 91, n. 3, p. 421-30, 2001.
- BERTERECHE, M. V. et al. Decreased taste sensitivity in cancer patients under chemotherapy. **Support Care Cancer**, v. 12, p. 571-6, 2004.
- BLOCK, K. I. Antioxidants and cancer therapy: furthering the debate. **Integr. Cancer Ther.**, v. 3, n. 4, p. 342-8, 2004.
- BLOT, W. J. et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 1483-92, 1993.
- BOYD, N. F. et al. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. **Br. J. Cancer**, v. 89, p. 672-1685, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- BROWN, J. K. et al. Nutrition and physical activity during and after cancer treatment: an American Cancer Society guide for informed choices. **CA Cancer J. Clin.**, v. 53, p. 268-91, 2003.
- DIETZ, A. T. Body size and risk of breast cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, p. 1011-9, 1997.
- DIVISI, D. et al. Diet and cancer. **Acta Biomed**, v. 77, p. 118-23, 2006.
- DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1-21, 2004.
- DUNCAN, A. M. The role of nutrition in the prevention of breast cancer. **AACN Clin. Issues**, v. 15, p. 119-35, 2004.
- FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Canc.**, v. 48, p. 375-82, 2002.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 636-46, 2000.

GARDINER, T. β -glucan biological activities: a review. **Glycoscience and Nutrition**, v. 1, p. 1-6, 2000.

GIBSON, R. S. Food consumption of individuals. In: _____. **Principals of nutritional assessment**. Oxford: Oxford University Press, 1990.

GORIS, A. H. C.; WESTERTERP-PLANTEGA, M. S.; WESTERTERP, K. R. Undereating and underrecording of habitual food intake in obese men: selective underreporting of fat intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, n. 1, p. 130-4, 2000.

HENNEKENS, C. H. et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence malignant neoplasms and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, London, v. 334, n. 18, p. 1145-9, 1996.

HOLM, L. E. et al. Treatment failure and dietary habits in women with breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 32-6, 1993.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Research council. Food and Nutrition Board. **Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and aminoacids (macronutrients)**. Washington: National Academy Press, 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Research council. Food and Nutrition Board. **Dietary references intakes for calcium, phpsphorus, magnesium, vitamin D and fluoride**. Washington: National Academy Press, 1999.

INSTITUTE OF MEDICINE. NATIONAL Research council. Food and Nutrition Board. **Dietary references intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**. Washington: National Academy Press, 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Research council. Food and Nutrition Board. **Dietary references intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc**. Washington: National Academy Press, 2002.

JAKOVLJEVIC, J. et al. Dietary intake of selected fatty acids, cholesterol and carotenoids and estrogen receptor status in premenopausal breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 75, n. 1, p. 5-14, 2002.

KEY, T. J. et al. Diet, nutrition and prevention of cancer. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 187-200, 2004.

KEY, T. J. et al. Nutrition and breast cancer. **Breast.**, v. 12, p. 412-6, 2003.

KLEIN, V. et al. Low alpha-linolenic acid contento f adipose breast tissue is associated with an increased risk of breast câncer. **Eur. J. Cancer**, v. 36, n. 3, p. 335-40, Feb. 2000.

KUSHI, L.; GIOVANNUCCI, E. Dietary fat and cancer. **Am. J. Med.**, v. 113, n. 9, p. 63s-70s, 2002.

LA VECCHIA, C.; FAVERO, A.; FRANCESCHI, S. Monounsaturated and other types of fat, and the risk of breast cancer. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 7, n. 6, p. 461-4, Dec. 1998.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants in cancer therapy: their actions and interactions with oncologic therapies. **Altern. Med. Review**, v. 4, n. 5, p. 304-29, 1999.

LESPERANCE, M. L. et al. Mega-dose of vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: an historical cohort study. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 76, n. 2, p. 137-43, 2002.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. **Anthropetric standardization reference manual**. Champaign, Illinois: Abridged: Human Kinetics Books, 1991. 90p.

LOI, S. et al. Obesity and out comes in premenopausal and postmenopausal breast cancer. **Cancer Epidemol. Biomarks Prev.**, v. 14, n. 7, p. 1681-91, 2005.

LYLY, M. et al. The effect of fibre amount, energy level and viscosity of beverages containing oat fibre supplement on perceived satiety. **Food and Nutrition Research**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2010.

MALZYNER, A.; CAPORENO, R. Conseqüências nutricionais do tratamento quimioterápico. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 399-406.

MANNION, C. et al. Components of an anticancer diet: dietary recommendations, restrictions and supplements of the bill henderson protocol. **Nutrients**, v. 3, p. 1-26, 2011.

MARTIN-MORENO, J. M. et al. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. **Int. J. Cancer**, v. 15, n. 58, p. 774-80, Sep. 1994.

MASKARINEC, G. et al. Dietary changes among cancer survivors. **Eur. J. Cancer Care**, v. 10, p. 12-20, 2001.

MATIAZI, H. J. **Otimização de extração de glucana da parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* e sua ação hipocolesterolemica e antimutagênica**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2005.

MAUNSELL, E. et al Dietary change after breast cancer: extent, predictors, and relation with psychological distress. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 4, p. 1017-25, 2002.

MEYENFELDT, M. Cancer-associated malnutrition: an introduction. **Eur. J. Oncol. Nurs.**, v. 9, p. S35-8, 2005.

MICHELS, K. B. et al. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. **Cancer.**, v. 109, n. 12, suppl., p. 2712-49, 2007.

MUINDI, J. R. F. Retinoids in clinical cancer therapy. **Cancer Treat. Res.**, New York, 1996, v. 87, p. 305-42.

NISSEN, S. B. et al. Intake of vitamins A, C, and E from diet and supplements and breast cancer in postmenopausal women. **Cancer Causes Control**, v. 14, p. 695-704, 2003.

- OMENN, G. S. et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 88, n. 21, p. 1550-8, 1996.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Physical Status**: the use and interpretation of anthropometry. WHO technical report series 854. Geneva: WHO, 1995.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **World Health Report 2002**: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: WHO, 2002.
- PAN, S. Y. et al. Antioxidants and breast cancer risk: a population based case-control study in Canada. **BMC Cancer**, v. 11, p. 372, 2011.
- PATTERSON, R. E. et al. Changes in food sources of dietary fat in response to an intensive low-fat dietary intervention: early results from the Women's Health Initiative. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 103, n. 4, p. 454-60, 2003.
- PIERCE, J. P. et al. Influence of a diet very high in vegetables, fruit and fiber and low in fat on prognosis following treatment of breast cancer. The women's healthy eating an living (WEL) randomized trial. **JAMA.**, v. 298, n. 3, p. 289-98, 2007.
- ROCK, C. L.; DEMARK-WAHNEFRIED, W. Nutrition and survival after the diagnosis of breast cancer: a review of the evidence. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 15, p. 3302-16, 2002.
- ROGERS, A. E. Diet and breast cancer: studies in laboratory animals. **J. Nutr.**, v. 127, n. 5, suppl., p. 933s-5s, 1997.
- SALMINEN, E. et al. Female patients tend to alter their diet following the diagnosis of rheumatoid arthritis and breast cancer. **Prev. Med.**, v. 34, p. 529-35, 2002.
- SANDULA, J.; MACHOVÁ, E.; HRIBALOVÁ, V. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana and its water-soluble derivatives. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 323-6, 1995.
- SCHRAUZER, G. N. Anticarcinogenic effects of Selenium. **Cel. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 1864-73, 2000.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defense: vitamins E, C and carotenoids. **Diabetes**, v. 46, n. 5, suppl. 2, p. 14-8, 1997.
- STOLL, B. A. Breast cancer and western diet: role of fatty acids and antioxidant vitamins. **Eur. J. Cancer**, v. 34, n. 12, p. 1852-9, 1998.
- STOLL, B. A. Can supplementary dietary fibre suppress breast cancer growth? **Br. J. Cancer**, v. 73, n. 5, p. 557-9, 1996.
- TAO, M. H. et al. Association of overweight with breast cancer survival. **Am. J. Epidemiol.**, v. 163, p. 101-7, 2006.
- THOMSON, C. A. et al. Increased fruit, vegetable and fiber intake and lower fat intake reported among women previously treated for invasive breast cancer. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 102, n. 6, p. 801-8, 2002.

TRINTIN, L. A. Avaliação nutricional. In: IKEMORI, E. H. A. et al. **Nutrição em Oncologia**. São Paulo: Lemar, 2003. p. 45-82.

UNITED STATES OF AMERICAN. U. S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. Beltsville: USDA, 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2004.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006.

WILLET, W. C. Diet and breast cancer. **J. Intern. Med.**, v. 249, p. 395-411, 2001.

WILLETT, W. C. Goals for nutrition in the year. **Cancer J. Clin.**, v. 49, p. 331-52, 2000.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. American Institute For Cancer Research. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington, DC: AICR, 2007.

ZABOTTO, C. B.; VIANA, R. P. T.; GIL, M. F. **Registro fotográfico para inquéritos dietéticos: utensílios e porções**. Campinas: Unicamp, 1996. 74p.

ZHANG, S. et al. Better breast cancer survival for postmenopausal women who are less overweight and eat less fat: The Iowa Women's Health Study. **Cancer.**, v. 76, p. 275-283, 1995.

ZHANG, S. et al. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 547-56, 1999.

8 CONCLUSÕES FINAIS

Frente aos resultados encontrados cabe ressaltar que o mecanismo pelo qual a β -glucana pode interagir com o DNA ou com as enzimas envolvidas na replicação e no reparo do mesmo, ainda precisa ser mais bem estudado para que se possa discutir sua capacidade bioantimutagênica, além de saber se as β -glucanas de diferentes origens possuem o mesmo mecanismo de ação e eficácia na prevenção de danos ao DNA.

Até agora, existem poucos dados científicos de estudos clínicos sobre o uso de β -glucana purificada em pacientes com câncer. Nossos resultados mostraram que a suplementação de um grama de β -glucana, por 84 dias, não alterou o estado nutricional das pacientes com câncer de mama, foi capaz de reduzir os níveis séricos de LDL-colesterol e triacilgliceróis, aumentou os níveis de hemoglobina, hematócrito, basófilos e eosinófilos e reduziu significativamente o estresse oxidativo, via redução do óxido nítrico.

Portanto a β -glucana poderia ser um importante nutriente adjuvante para pacientes com câncer durante o tratamento antineoplásico.

9 INTERVENÇÃO

Todas as pacientes receberam retorno quanto aos resultados do estado nutricional e exames laboratoriais. Aquelas que tiveram alterações foram encaminhadas para acompanhamento do serviço de nutrição do ICL.

No último encontro todas as pacientes receberam orientações nutricionais gerais de acordo com o estado nutricional e orientações específicas em relação aos efeitos da quimioterapia na alimentação.

E por fim, também foi realizado um ciclo de palestras sobre a importância da alimentação durante a quimioterapia para as pacientes e para os funcionários do setor de quimioterapia do ICL.

ANEXOS

ANEXO A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Identificação:

Nome do voluntário		
Nome do responsável:		
Endereço:		
Cidade:		
Bairro:	CEP:	Estado:
Telefone:		
RG do responsável:	RG: voluntário	

Título da Pesquisa: Efeito da suplementação da β -glucana sobre o perfil metabólico-nutricional, modulação da imunidade, antigenotoxicidade e anticlastogenicidade em mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia.

Objetivo: Avaliar os efeitos da suplementação de uma fibra, denominada β -glucana, em mulheres com câncer de mama que irá fazer quimioterapia durante 4 semanas.

Procedimento: Para que essa avaliação seja possível será necessário estudar o hábito alimentar (quantidade e qualidade do que come). Conhecer a composição corporal (peso, altura e IMC), analisar os exames laboratoriais de colesterol total e frações e também o exame das células vermelhas (hemograma) e células brancas (leucograma), além de observar as mudanças no DNA da célula por meio de testes de cometa e micronúcleo de acordo com as fotos mostradas abaixo. As mulheres com câncer de mama que concordarem em participar da pesquisa, serão divididas em 2 grupos, ao acaso, sendo que, cada uma delas deverão ingerir uma cápsula diariamente. Uma dessas cápsulas conterá gelatina e a outra a fibra. **Os indivíduos participantes do projeto poderão desistir a qualquer momento sem prejuízos médicos, nutricionais e pessoais.**

Riscos e Benefícios: Esta pesquisa não apresenta riscos às pacientes com câncer de mama, pois a suplementação contendo beta-glucana ou gelatina não é tóxica ou capaz de provocar nenhum efeito colateral grave.

Os benefícios esperados são: melhorar os parâmetros nutricionais e bioquímicos e os efeitos colaterais da quimioterapia.

Se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa em Seres humanos da UEL no endereço: Av. Robert Kock, 60, vila operária, telefone: 3371 – 2490, ou em contato com a pesquisadora Clisia Mara Carreira, docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEL, 3371 – 2470/ 9928 – 5199/ clisiamc@hotmail.com.

Consentimento Pós-informado.

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido projeto de pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

Assinatura do voluntário


Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO B

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UEL



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Parecer Nº 006/07 CAAE Nº 0007.0.268.000-07 FOLHA DE ROSTO Nº 122129	Londrina, 28 de fevereiro de 2007.
PESQUISADOR(A): CLISIA MARA CARREIRA	
<p>Ilmo(a) Sr(a),</p> <p>O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina – CEP – UEL – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, APROVA a realização do projeto: “EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA BETA-GULCANA SOBRE O PERFIL METABÓLICO-NUTRICIONAL, MODULAÇÃO DA IMUNIDADE, ANTIGENOTOXICIDADE E ANTICLASTOGENICIDADE EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA”.</p> <p>Informamos que o(a) Sr.(a) deverá comunicar, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa e deverá ser apresentado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p> <p>Situação do Projeto: APROVADO</p>	
<p style="text-align: center;">Atenciosamente,</p> <p style="text-align: center;">  Profª. Dra. Nilza Maria Diniz Comitê de Ética em Pesquisa Coordenadora </p>	

ANEXO C

Protocolo de Pesquisa



Universidade Estadual de Londrina

Efeito da suplementação da β -glucana sobre o perfil metabólico-nutricional, modulação da imunidade, antigenotoxicidade e anticlastogenicidade em mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia

Data: __/__/__ Data Nascimento: __/__/__ Idade: _____ n° prontuário ou Hygia: _____

Nome: _____ sexo: _____

Estado Civil: _____ n° de filhos: _____ Ocupação: _____

Renda familiar mensal: _____ N° de pessoas que moram na casa: _____

Tabagista: () Sim () Não quantos/dia _____ Etilista: () Sim () Não copos/dia _____

Hábito intestinal: () 1 x dia () 3 x semana () 2 x semana () _____

Água: ___ copos/dia ou ___ litros/dia

Atividade física: qual: _____

() Leve () Moderada () intensa

Antecedentes familiares: () Obesidade () Diabético () Hipertensão

() Dislipidemia () Câncer () IRC

() outros _____

Patologias pessoais associadas:

() Anemias _____ () Diabetes () Hipertensão () Dislipidemia _____

() Osteoporose () gastrite ou úlcera () Outros. O que? _____

Diagnóstico médico: _____

Analgésico:	diurético:	quimioterápicos:
anticonvulsivante:	corticosteróides:	oral:
Antibiótico:	Terapia hormonal:	
Antihipertensivo:	Hipoglicemiantes:	Parenteral:
antidepressivos:	Insulina:	

MEDICAMENTOS EM USO:**EFEITOS COLATERAIS: QUIMIOTERAPIA**

Data: __/__/__ (G2)

Data: __/__/__ (G3)

Data: __/__/__ (G6)

() náuseas (__ x na semana)	() náuseas (__ x na semana)	() náuseas (__ x na semana)
() vômitos (__ x na semana)	() vômitos (__ x na semana)	() vômitos (__ x na semana)
() anorexia(__ x na semana)	() anorexia(__ x na semana)	() anorexia(__ x na semana)
() obstipação(_ x na semana)	() obstipação(_ x na semana)	() obstipação(_ x na semana)
() diarreia (__ x na semana)	() diarreia (__ x na semana)	() diarreia (__ x na semana)
() câimbras(__ x na semana)	() câimbras(__ x na semana)	() câimbras(__ x na semana)
() monilíase (_ x na semana)	() monilíase (_ x na semana)	() monilíase (_ x na semana)
() febre (__ x na semana)	() febre (__ x na semana)	() febre (__ x na semana)
() eructações (_ x na semana)	() eructações (_ x na semana)	() eructações (_ x na semana)
() flatulência (_ x na semana)	() flatulência (_ x na semana)	() flatulência (_ x na semana)
() astenia(__ x na semana)	() astenia(__ x na semana)	() astenia(__ x na semana)
() outros _____	() outros _____	() outros _____

DADOS LABORATORIAIS:

Exame / Data	Hb	Ht	Leu	LinF	Monóc	Bas	Neutr	Colesterol Total	LDL- Col	HDL- Col	TGL
INICIAL											
FINAL											

INQUÉRITO NUTRICIONAL

GRUPOS DE ALIMENTOS	1x sem	2x sem	4 x sem	todos dias	cada 15 dias	1x mês	outros (qual)
Leguminosas							
Cereais							
Frutas							
Legumes cozidos							
Verduras cruas							
Leite							
Derivados do leite							
Carnes vermelhas							
Carnes brancas							
ovos							
Cereais integrais/fibras							
Doces e guloseimas							
Aversões alimentares: _____ Restrições alimentares: _____ Grupo experimental: () cápsula cor 1 () cápsula cor 2							

HISTÓRIA DIETÉTICA (recordatório de 24h)

