



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO JULIANO OLIVEIRA

**MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITO PROTETOR DE DANOS NO
DNA DO POLISSACARÍDEO β -GLUCANA EM TESTES *IN VITRO*
*E IN VIVO***

Londrina
2006

RODRIGO JULIANO OLIVEIRA

**MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITO PROTETOR DE DANOS NO
DNA DO POLISSACARÍDEO β -GLUCANA EM TESTES *IN VITRO*
*E IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2006

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48m Oliveira, Rodrigo Juliano.
Mecanismos de ação e efeito protetor de danos no DNA de polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro* e *in vivo* / Rodrigo Juliano Oliveira. – Londrina, 2006.
179f. : il.

Orientador: Mário Sergio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Inclui bibliografias.

1. Ácido desoxirribonucleico – Teses. 2. Polissacarídeos – Teses. 3. Antimutagênese – Teses. 4. Genética molecular – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 575.1

RODRIGO JULIANO OLIVEIRA

**MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITO PROTETOR DE DANOS NO
DNA DO POLISSACARÍDEO β -GLUCANA EM TESTES *IN VITRO*
*E IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Veronica Elisa Pimenta
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllus Cólus
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 16 de fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS: SONIA E WAGNER

Mãezinha,

Foi tão fácil fazer as outras dedicatórias... A monografia de bacharelado, a de licenciatura e a de pós-graduação... Em todas existia mais uma figura que com a senhora me ajudar a seguir sempre em frente.

Recordo-me hoje de todas as dificuldades enfrentadas. Lembro-me do dia em que vocês foram me levar à rodoviária e o quanto chorei quando deixei a casa paterna. Sentia que ali, com você e com o Pai, ficava toda uma vida.

Os primeiros tempos foram de muita dor. Mas, depois entendi que o meu destino era seguir... Era tomar conta da maior herança que os pais podem deixar para os seus filhos: os estudos.

No entanto, no meio desta grande corrida nós perdemos alguém muito importante. Este ano, que está se findando, foi o de maiores transformações para todos nós. Lembro-me que no meio de tantas outras sempre existia uma coisa que não se alterava... Acontecesse o quê acontecesse sabia que era só pegar o telefone e pedir socorro que a senhora e o pai estavam sempre prontos a ajudar.

Num domingo destes, que se passou isso deixou de ser verdade. Hoje o Pai não está mais conosco. Ou está. Não sei... O que sei é que apesar de tudo não me sinto sozinho.

Uma amiga que sempre esteve comigo neste ano, tão difícil, diz que durante a noite eu ainda chamo por ele. Engraçado que eu nunca me lembro dos meus sonhos. Mas, no meio deste espanto eu agradeço a Deus por ter me dado a solidez de nossa família porque foi por isso que consegui trilhar todos os caminhos até aqui.

Hoje encerra mais uma etapa. Aquela que principalmente a senhora, o Pai e eu sonhamos desde novembro de 2003. Desta forma dedico à senhora e a ele esta dissertação e aproveito para agradecer O AMOR QUE TRANSPÔS INCÓLUME ETAPAS TÃO DIFÍCEIS.

A DEUS

Hoje ainda não consigo precisar o quanto me fez forte para chegar até aqui. Mas, agradeço a cada uma das dificuldades e pela capacidade de acreditar que todas elas foram para o meu crescimento. Faltam-me palavras, por isso escolho estas que já se fazem tão conhecidas:

NENHUM CAMINHO É TÃO LONGO QUANDO SE LEVA UM AMIGO...

Mas às vezes me pergunto: "Meu Deus, meu Deus, porque me abandonastes? (Mt 27,46)" No entanto, a resposta é rápida. "... Jesus não se deixa vencer pela dor; como que por uma alquimia divina, Ele transforma a dor em amor, em vida... Neste sofrimento eu te amo, Jesus Abandonado. És tu que, assumindo como tua a minha dor, vens me visitar. Então eu te quero, te abraço!"

Chiara Lubic

Março/2005.

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre Prof. Dr. MÁRIO SÉRGIO MANTOVANI,

Lembro-me ainda daquela sexta-feira quando estive aqui pela primeira vez e na qual lhe pedi a oportunidade de concorrer à vaga do mestrado. Quando voltei para casa fiquei pensando se realmente teria a oportunidade de desfrutar destes dois anos de convivência. Quando saí da prova pensei não ter passado. Mas, para minha surpresa no ano de 2004 estava aqui sob sua orientação.

Confesso que não foi simples mudar de área e sempre tinha a dúvida se eu iria corresponder às suas expectativas. Aprendi muito neste período seja com a convivência com o pesquisador ou com o amigo.

Gostaria de agradecer por acreditar em mim, me encorajar, me fazer refletir e me apoiar quando disse querer fazer a integração entre a genética toxicológica e a biologia do desenvolvimento, minha antiga área de pesquisa.

"Nós sempre temos tendência de ver coisas que não existem, e ficar cegos para as grandes lições que estão diante dos nossos olhos."

De o Diário de um Mago

Assim, agradeço pelos ensinamentos até o momento e espero que continue a aprender muito com o senhor durante o Doutorado o qual certamente iniciaremos logo.

À Professora Dra. LÚCIA REGINA RIBEIRO, Pelo apoio incondicional no início desta nova fase: o doutorado.

À Professora Dra. MARIA JOSÉ SPARÇA SALLES DE FARIA,

"Para atingir seu sonho, o guerreiro da luz precisa de uma vontade firme e de uma imensa capacidade de entrega. Embora tenha um objetivo, nem sempre o caminho pra atingí-lo é aquele que se imagina."

De Manual do Guerreiro da Luz

Assim, gostaria de agradecer por acreditar nos meus objetivos e auxiliar-me a encontrar o caminho correto. Obrigado pelos conselhos, pela amizade e por ter me recebido em seu laboratório para que pudesse concretizar parte de meu sonho.

Aos meus irmãos **ELKA, ADRIANO, LUCIANO,**

Muitas são as divergências, os sonhos tão diferentes. Porém, uma coisa é comum a dedicação de cada um de vocês para que eu chegasse até aqui. Obrigado pelas renúncias que tiveram que fazer para que nossos pais pudessem me ajudar a realizar mais este sonho. Vocês são e sempre serão parte deste sonho agora já sonhado.

À **ADRIANE E VICTORIA,**

Drica, obrigado por ter vindo fazer parte de nossa família. E mais uma vez obrigado pela dom da vida de Victória. Obrigado ainda por acreditar no meu potencial, ser tão disprezada e por isso ter me ajudado tanto nestes anos que estou fora de casa. Vitória, obrigado por ter amadurecido tão depressa e por ter dividido as alegrias e dificuldades destes últimos tempos. Obrigado pela cumplicidade e pela solidariedade.

Aos meus familiares, na magnífica pessoa da minha **VÓ MAURA,**

Todos vocês sabem que contribuíram para minha formação. Mas, aproveito a oportunidade de agradecer-lhe na pessoa da vó. Obrigado por mais este ano de convivência e auxílios constantes. Nunca mais me esquecerei desta pessoa amiga que descobri na senhora. Desculpe-me por ter sido um neto tão arredo nos primeiros tempos.

À amiga **BEATRIZ ALVES ALMEIDA,**

Você já deve estar cansada de ler ou de ouvir isso. Mas, eu não me canso. Obrigado por me fazer entender que um dia precisamos deixar a casa paterna para alcançarmos os nossos objetivos e concretizarmos os sonhos. Enfim, que precisamos seguir o desígnio que Deus nos propõe.

À irmã CLISIA MARA CARREIRA,

Dizer-te o quê meu grande Amor? Você sabe que fez e que faz parte da minha vida. Os momentos são tantos que nem conseguiria listá-los. Obrigado por ajudar-me, a saber, para onde caminhar e por entender-me e apoiar-me em todas as circunstâncias. Sei que este ano fiquei em falta com você. Mas, prometo ser mais atencioso e quero que nossas vidas voltem a ser eternos espetáculos de luzes e danças. Enfim, nascemos para a dança, para as luzes, para o calor humano. Nossas vidas acadêmicas, na verdade, são apenas os passatempos preferidos. Continue brilhando como sempre.

Às famílias CANÓNICO e CARREIRA,

A minha adaptação no Paraná foi muito facilitada porque todos vocês acolheram-me como se eu realmente fosse um membro da família e até hoje me sinto neto, filho, primo. Enfim, um membro destas famílias que de forma tão especial me acompanharam nestes dois anos. Mãe Deise, obrigado pelo carinho. Obrigado pela presença na qualificação.

Às irmãs ARIANE FERNANDA DA SILVA e RENATA MATUO,

Meninas é tão difícil dizer o quê cada uma de vocês representa para mim... Mas, vou tentar...

"O caminho ao triunfo torna-se solitário, porque a maioria dos homens não está disposta a enfrentar e vencer os obstáculos que se escondem nele. A capacidade de dar esse último passo, quando estás esgotado, é qualidade que separa os ganhadores dos demais corredores."

Vocês me ajudaram a vencer. Empuraram-me para dar os últimos passos. Re, obrigado por todas ajudas e auxílios. Ari, obrigado pela presença constante, por todos os momentos, aflições e felicidades compartilhadas. Saibam que possuem raízes em meu coração e que daqui jamais sairão.

À ANA CAROLINA DOS SANTOS LOURENÇO, TATIANE YUMI

NAKAMURA KANNO e VÉSSIA DA SILVA LEITE,

Obrigado pela ajuda incondicional. Obrigado por tão bem me receberem no grupo de pesquisa de Reprodução Animal. Cada uma de vocês possui uma característica que as tornam especiais. Mas, com uma coisa em comum: a capacidade de se doar aos amigos.

Aos amigos dos primeiros dias ALINE POERSCH, MARILANDA FERREIRA

BELLINI e LEONARDO NEVES CABRIOTI,

Pelo auxílio nos primeiros passos no Laboratório de Mutagênese *in vitro*. Mari, obrigado pelos sorrisos diários e que me ajudaram a superar os períodos de adaptação. Pena que hoje não está mais conosco. Mas, continuo torcendo por você. Aline, por sempre me encorajar e me ajudar em tantas decisões difíceis. Obrigado por me acompanhar e estar presente até hoje.

À amiga MARIANA BERTOLOTTI ALVES PEREIRA,

Obrigado pelos muitos momentos compartilhados. Pelas imensas ajudar no RU e pelo desprendimento e dedicação demonstrado em todos os dias destes dois anos.

À unidade GEN de Londrina nas pessoas de DOMINGOS, GEISON, LUCAS

e LUÍS ÂNGELO,

Pelo companheirismo e total apoio neste período em Londrina. Pelas experiências compartilhadas e pela vida sempre doada.

Às professoras ANA LÚCIA DIAS e LÚCIA GIULIANO CAETANO, Pela

compreensão, momentos de desabafos e auxílios nestes dois anos.

À professora ROSÂNGELA MARIA PINTO MOREIRA, Pelos

auxílios nas análises estatísticas.

À professora **LEDA MARIA KOELBLINGER SODRÉ**, Pelas
conversas e conselhos no início do curso.

Às professoras **ANA LÚCIA DIAS**, **BERENICE QUINZANI JORDÃO**,

ILCE MARA DE SYLLUS CÓLUS E **VERONICA ELISA PIMENTA**,

Por aceitarem participar de minhas bancas de qualificação e defesa de dissertação de mestrado.
Pelas contribuições para a redação final dos artigos.

Aos amigos **DÁRIO**, **MELISSA** E **SUELI**,

Pelas ajudas incessantes. Pelos socorros nas autoclavegens no material e nos apuros para compreender
os direitos de deveres de um mestrando. Pelo ombro amigo na hora dos choros e das dificuldades.

Pelos conselhos e cumplicidade.

À **CAPES**, **CNPq** E **FUNDAÇÃO ARAUCÁIA** : Pela bolsa de estudo e
pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao **PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**:

Pelas oportunidades proporcionadas e pela formação a mim doada.

Aos amigos do **MESTRADO** e do **DEPARTAMENTO de BIOLGIA**

GERAL: Discentes, Docentes e Funcionários.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano. **Mecanismos de ação e efeito protetor de danos no DNA do polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro* e *in vivo*.** 2006. 180f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Atualmente, um grande número de substâncias que contaminam o ambiente são advindas de ações antropogênicas e estão relacionadas ao aparecimento de patologias crônicas como o câncer. Muitos medicamentos usados em diferentes terapias alopáticas não possuem uma adequada avaliação e por isso observam-se diferentes efeitos colaterais, dentre eles alterações nas moléculas de DNA que podem também relacionar-se ao aparecimento de cânceres. Frente a estes fatos e aos estilos de vida, faz-se cada vez mais necessário a identificação de substâncias com potencial quimiopreventivo. Devido à possibilidade de a dieta controlar e modular várias funções orgânicas e contribuir para a manutenção da saúde humana, reduzindo o risco de aparecimento de patologias, este estudo teve por objetivo avaliar o mecanismo de ação do polissacarídeo de β -glucana, constituinte de alimentos funcionais, bem como compreender seus efeitos como um agente antígeno-tóxico, antimutagênico e a sua capacidade de preservação da viabilidade celular em testes *in vitro* em células CHO-k1, CHO-xrs5 e HTC. Em sistemas-teste *in vivo*, camundongos Swiss (*Mus musculus*), pretendeu-se avaliar a influência da β -glucana no desempenho reprodutivo e desenvolvimento da prole, assim como verificar sua capacidade preventiva em danos mutagênicos, teratogênicos e em alterações na performance reprodutiva causados por exposição à ciclofosfamida. A presente pesquisa demonstrou que independentemente da origem da β -glucana, extraída de cevada ou *Saccharomyces cerevisiae*, esta possui tanto atividade por desmutagênese como por bioantimutagênese frente a agentes indutores de danos de ação direta e indireta. A avaliação dos diferentes protocolos e das porcentagens de redução de danos em células proficientes em metabolismo permite sugerir que o polissacarídeo em questão possui uma menor eficiência em bioantimutagênese. Assim, os experimentos realizados com células deficientes em reparo, CHO-xrs5, confirmam esta hipótese. Faz-se ainda necessário relatar que a β -glucana melhora o índice de viabilidade celular, prevenindo eventos de apoptose, e que a eficiência e determinação do mecanismo de ação estão sujeitos a variações quando comparadas as duas linhagens celulares, visto que em HTC, sistema metabolizador, o polissacarídeo em estudo pode ter sua eficiência quimiopreventiva diminuída, podendo levar a conclusões errôneas a respeito de seu mecanismo de ação. Os estudos *in vivo* indicam que a β -glucana foi eficiente em prevenir danos clastogênicos tanto em fêmeas prenhes como não prenhes. Demonstrou ainda que as fêmeas grávidas parecem ser mais susceptíveis aos danos genéticos. Já os efeitos teratogênicos não foram prevenidos de forma eficiente. No entanto, apesar da β -glucana não ter prevenido as malformações ela mostrou-se muito eficiente no aumento da viabilidade fetal e redução das taxas de perdas pós-implantacional e reabsorção demonstrando-se assim uma melhora da performance reprodutiva. Assim, verifica-se que a β -glucana possui baixo potencial na prevenção de malformações, mas quando presente em alimentos, confere a este características nutraceuticas, podendo participar da suplementação de dietas ou talvez compor um novo fármaco a ser utilizado na prevenção de danos genéticos e como adjuvante nas quimioterapias às quais pacientes oncológicos são submetidos.

Palavras-chave: Ácido desoxirribonucleico. Polissacarídeos. Antimutagênese. Genética molecular.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano. **Mecanismos de ação e efeito protetor de danos no DNA do polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 180f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Today, a great number of substances that contaminate the environment stem from anthropogenic actions and are related to the presence of chronic pathologies such as cancer. A lot of drugs used in different allopathic therapies are not evaluated properly and consequently different collateral effects are observed, among them alterations in the DNA molecules that can also be related to the emergence of different types of cancer. In face of these facts and life styles, the identification of substances with chemopreventive potential becomes necessary. Due to the possibility of the diet controlling and modulating several organic functions as well as contributing to the maintenance of human health, reducing the risk of the emergence of pathologies, the purpose of this study was to evaluate the mechanism of action of the β -glucan polysaccharide, which exists in functional foods, as well as to understand its effects as an antigenotoxic, antimutagenic agent and its capacity of preserving the cell viability in *in vitro* tests in the following cells: CHO-k1, CHO-xrs5 and HTC. In *in vivo* test-systems with Swiss mice (*Mus musculus*), it was intended to evaluate the β -glucan influence on the reproductive performance and offspring development, as well as to verify its preventive capacity in mutagenic, teratogenic damages, and in alterations in the reproductive performance caused by the exposition to cyclophosphamide. This research showed that independently from the β -glucan origin, extracted from barley or *Saccharomyces cerevisiae*, it has activity by dismutagenesis or bioantimutagenesis in face of agents that induce to direct and indirect action damages. The evaluation of the different protocols and the damage reduction percentages in proficient cells in 14 report that the β -glucan improves the cell viability index, preventing from apoptosis events, and that the efficiency and determination of the mechanism of action are subject to a metabolizing system, the polysaccharide under study can have its chemopreventive efficiency decreased, leading to erroneous conclusions concerning its mechanism of action. The *in vivo* studies show that the β -glucan was efficient in preventing clastogenic damages in pregnant and non-pregnant females. It was also demonstrated that the pregnant females seem to be more susceptible to genetic damages. The teratogenic effects were not prevented efficiently. However, in spite of the β -glucan not having prevented malformations, it showed to be very efficient in the increase of the fetal viability and reduction of post-implantation and re-absorption loss taxes, showing an improvement of the reproductive performance. Thus, it is verified that the β -glucan has low potential in the malformations prevention, but when it is present in foods, it gives them nutraceutical characteristics, being able to supplement diets or perhaps become a new drug to be used in the prevention of genetic damages and as adjuvant in chemotherapies undergone by oncologic patients. The metabolism makes it possible to suggest that the polysaccharide in question is less efficient in terms of bioantimutagenesis. Thus, the experiments carried out with deficient cells under repair, CHO-xrs5, confirm this hypothesis. Variations are still necessary when compared to two cell lines, since HTC, 15.

Keywords: Deoxyribonucleic acid. Polysaccharides. Antimutagenesis. Molecular genetics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	17
1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DA P-GLUCANA	19
1.3 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE	24
1.4 CULTURA DE CÉLULAS	27
1.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	28
1.5.1 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese.....	28
1.5.2 Ensaio do Cometa	29
1.5.3 Ensaio de Viabilidade Celular	30
1.6 Sistemas-teste in vivo	31
1.6.1 Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico	33
1.6.2 Ensaio de Teratogenicidade.....	34
1.6.2.1 Obtenção dos Fetos e Avaliação da Performance Reprodutiva.....	34
1.6.2.2 Exame dos Fetos para a Detecção de Anormalidades Externas, Viscerais e Esqueléticas	35
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 ARTIGO 1	38
RESUMO	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 AGENTES QUÍMICOS	43
2.2 LINHAGENS CELULARES	43
2.3 TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BINUCLEADAS.....	44
2.4 ANÁLISES DAS LÂMINAS E ESTATÍSTICA.....	46
3 RESULTADOS	47
4 DISCUSSÃO	49
5 REFERÊNCIAS	56

4 ARTIGO 2	64
RESUMO	65
1 INTODUÇÃO	67
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1 AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA.....	68
2.2 EXTRAÇÃO DAS JP-GLUCANAS	68
2.3 LINHAGEM CELULAR	69
2.4 TESTE DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE	70
2.5 TESTE DO COMETA.....	72
2.6 CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DE DANOS	74
2.7 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	75
3 RESULTADOS	76
4 DISCUSSÃO	80
5 REFERÊNCIA	90
5 ARTIGO 3	99
1 INTRODUÇÃO.....	102
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1 AGENTE INDUTOR DE DANOS NO DNA E TERATÓGENO.....	103
2.2 EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DA JP-GLUCANA	104
2.3 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	104
2.4 ENSAIO DE TERATOGENICIDADE	105
2.5 ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO	107
3 RESULTADOS	109
3.1 ENSAIO DE TERATOGENICIDADE	109
3.2 ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO	113
4 DISCUSSÃO	115
5 REFERÊNCIA	123
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
REFERENCIAS	146
ANEXOS	163

ANEXO 1 – Manuscript Submission for CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY	164
ANEXO 2 – Manuscript Submission for TOXICOLOGY IN VITRO	169
ANEXO 3 – Manuscript Submission for REPRODUCTIVE TOXICOLOGY	175

1 INTRODUÇÃO

O grande número de substâncias que contaminam o ambiente em que vivemos são advindas das ações antropogênicas e verifica-se um aumento crescente dos resíduos industriais, agrônômicos, domésticos e urbanos decorrentes do desenvolvimento das sociedades modernas. Os compostos químicos, físicos, poluição e agitação da vida moderna apresentam riscos potenciais para a saúde humana e estes podem assumir características benéficas, neutras ou prejudiciais quando da interação com os organismos vivos.

A genética toxicológica, com o uso de diversos sistemas-teste lança um olhar crítico sobre compostos que podem causar efeitos prejudiciais ao homem e outros seres vivos. Desta forma, esta ciência tem um importante papel na identificação de agentes genotóxicos e protetores.

A triagem de produtos químicos e amostras ambientais têm em ensaios microbianos uma rotina de fácil execução e grande utilidade (RABELLO-GAY et al., 1991). Os testes de mutagenicidade de muitas substâncias em microrganismos apresentam boa correlação com seu potencial carcinogênico em animais superiores e oferecem vantagens quanto ao custo e rapidez, mas essa associação pode ser falha, em alguns casos, devido à simplicidade e estrutura dos microrganismos e à capacidade metabólica dos sistemas. Assim, em geral, são mais relevantes os ensaios *in vivo* e *in vitro*, os quais são capazes de detectar mutações e alterações cromossômicas, usando plantas, insetos e mamíferos, inclusive o homem (BRUSICK, 1987).

Segundo Brusick (1987) os ensaios mais usados para a avaliação da indução de mutações e danos cromossômicos são aqueles que utilizam células de mamíferos, como por exemplo, células de linfoma de ratos, V79 (pulmão de hamster Chinês) ou CHO (ovário de hamster Chinês). Testes *in vitro* permitem avaliações de indução de danos no DNA como alterações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs, mutações gênicas e micronúcleos, dentre outros. Dentre os testes *in vivo* pode-se citar o ensaio do letal dominante, alterações cromossômicas, micronúcleos e mutações em *locus* específico (BRUSICK, 1987).

Os estudos na área de mutagênese têm por objetivo, na sua grande maioria, fazer uma correlação entre os resultados obtidos e os possíveis efeitos causados ao homem e este fato faz dos sistemas-teste com mamíferos os mais aceitáveis. No entanto, sistemas com outros animais, vegetais e microrganismos podem ser indicados segundo a finalidade do

estudo, do tipo de material a ser avaliado e das condições laboratoriais existentes (BRUSICK, 1987).

Em princípio, os pesquisadores reconheceram que a carcinogenicidade e mutagenicidade dos agentes químicos estavam correlacionadas, uma vez que a maioria dos carcinógenos químicos pode interagir com o material genético. Estudos apresentavam informações suficientes sugerindo que o câncer pode ser induzido por um evento mutacional (AMES et al., 1973; VOGEL, 1982), o qual é responsável pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (McKELVEY-MARTIN et al., 1998).

Os proto-oncogenes são genes que estão envolvidos em funções celulares normais, mas que são equivalentes a oncogenes carregados por alguns retrovírus. Em certos casos, mutações ou a ativação aberrante dos mesmos, na célula, está associada à formação de tumores. A ativação de um oncogene representa um evento de ganho de função, no qual um proto-oncogene celular é ativado inapropriadamente. Isto pode envolver uma modificação mutacional da proteína, uma ativação constitutiva da expressão do gene, a sua superexpressão ou a falha na inativação da sua expressão no momento adequado (LEWIN, 2001).

Os supressores tumorais são detectados por deleções ou outras mutações inativadoras que são tumorigênicas. A evidência mais convincente da natureza destes genes é fornecida por certos cânceres hereditários, que se desenvolvem em pacientes que perderam ambos os alelos e, portanto, não possuem um gene ativo. Uma mutação em um supressor pode representar uma perda de função em genes que normalmente impõem alguns limites ao ciclo celular ou ao crescimento celular (LEWIN, 2001).

Agentes químicos ambientais são importantes fatores tanto em termos de desenvolvimento como de prevenção do câncer. O fato de eventos mutagênicos serem de grande importância em carcinogenicidade sugere que certos cânceres humanos podem ser prevenidos pela identificação de agentes mutagênicos no ambiente (FERRARI, 1991). Também, atualmente, existe um grande interesse na identificação de substâncias presentes no meio que possuem atividade protetora contra o câncer a fim de resguardar as gerações futuras. Desta forma, as pesquisas em mutagênese destacam-se e os testes genéticos tornam-se cada vez mais úteis no rastreamento de agentes com potencial oncogênico e mutagênico, demonstrando que é cada vez mais urgente a utilização de métodos confiáveis capazes de detectar e medir danos causados no DNA (FERRARI, 1991), bem como estabelecer possibilidades de proteção e/ou redução desses.

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Diversos estudos, investigações epidemiológicas e experimentos *in vivo* e *in vitro*, demonstram que existe uma associação inversamente proporcional entre o consumo de frutas e verduras ricas em ácido ascórbico, fitoestrógenos e carotenóides, por exemplo, e o risco de desenvolvimento de cânceres e outras patologias (FLAGG et al., 1995; WEISBURGER, 1999; ZHANG et al., 1999; WEISBURGER, 2000; FERRARI, 2001; FERRARI & TORRES, 2002).

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes, bloqueadores de radicais livres. Além destes há os indutores da morte celular, inibidores enzimáticos (inibidores das enzimas do citocromo P450), inibidores da angiogênese, antagonistas de fatores de crescimento, hormônios e agentes reparadores de lesões do DNA (KLEINER, 1997; KELLOFF et al., 1999).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (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).

Ferrari e Torres (2002) descreveram várias substâncias com efeitos antimutagênicos, tais como: ácido fólico, cálcio, catequinas, fenil-isotiocianatos, indole-3-carbinol, isoflavonóides, limoneno, vitamina D, E, selênio, retinóides e resveratrole. O ácido fólico, presente principalmente no espinafre, brócolis e alface, está descrito como capaz de auxiliar no reparo de lesões do DNA. O cálcio, encontrado principalmente nos derivados do leite, possui a capacidade de induzir apoptose e liga-se aos ácidos biliares que são agentes ativos na produção de radicais livres. As catequinas, encontradas nos chás verdes e preto, promovem inibição do citocromo P450 e da cicloxigenase, promovem ainda inibição de angiogênese, induzem apoptose de células tumorais, em especial as prostáticas. Os limonenos, presentes, principalmente, nas frutas cítricas, possuem atividade inibitória da enzima farnesil-transferase que age na ativação de proto-oncogenes. A vitamina D que induz apoptose e diferenciação celular está presente em óleos e gorduras vegetais. No entanto, esta atividade está intimamente relacionada à exposição ao sol. A vitamina E e o selênio apresentam propriedades semelhantes e são capazes de promover imunestimulação e diminuição das

espécies de oxigênio reativas. A vitamina E é vastamente encontrada em óleos e gorduras, já o selênio em vegetais verdes cultivados em solos ricos neste elemento. Os retinóides promovem inibição da enzima tumoral ornitina-descarboxilase (ODC), do 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 resveratroles são encontrados nas cascas de uvas, sucos e vinhos tintos. Estes compostos causam indução de morte de células cancerígenas e inibição da interação de hormônios androgênicos com seus receptores em células de câncer prostático, principalmente (FERRARI; TORRES, 2002).

Os antioxidantes agem em três linhas de defesa orgânica contra as espécies de oxigênio reativas: (I) prevenção, que se caracteriza pela proteção contra formação das substâncias agressoras; (II) interceptação de radicais livres, os quais uma vez formados iniciam suas atividades de danificação do DNA (KONG; LILLEHEI, 1998; SANTOS; CRUZ, 2001); (III) quando a prevenção e interceptação não foram efetivas e os subprodutos da atividade dos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades, podendo se acumular no organismo, há a necessidade dos mesmos serem encaminhados à excreção pelas enzimas de detoxificação ao mesmo tempo que os mesmos antioxidantes modulem o sistema de reparo de DNA das células que estão sendo atacadas.

Os alimentos que possuem agentes antioxidantes constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (FERRARI; TORRES, 2002).

O conceito de alimentos funcionais provém da hipótese de que a dieta alimentar possa controlar e modular várias funções orgânicas, contribuindo para a manutenção da saúde e reduzindo o risco do aparecimento de patologias (BORGES, 2001).

Os alimentos funcionais possuem marcadores biológicos de sua função no organismo. Estes marcadores são, por exemplo, aumento do número de bactérias não-patogênicas no organismo, as quais auxiliam na digestão e absorção de nutrientes, aumento da tolerância à lactose e imunoestimulação (BORGES, 2001).

Para que um alimento seja classificado como funcional ele deve: (I) exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, (II) fazer parte da alimentação usual, (III) possuir efeitos positivos obtidos através de quantidades não tóxicas que devem persistir mesmo após a suspensão de ingestão e (IV) não deve ser utilizado com o intuito de tratar ou curar doenças (MILNER, 1999).

Os alimentos funcionais podem ser subdivididos em: probióticos, prebióticos e simbióticos. Os prebióticos são alimentos que não sofrem hidrólise ou absorção no intestino delgado; quando atingem o cólon, devem ser metabolizados seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas e devem ser capazes de induzir efeito fisiológico que seja importante para a saúde. Os probióticos foram definidos como organismos vivos que quando ingeridos promovem efeito benéfico no balanço da florabacteriana intestinal e na saúde do hospedeiro. Os simbióticos são aqueles alimentos que reúnem todas as características já mencionadas (GIBSON, 1999).

A partir deste momento será dispensada uma maior atenção aos prebióticos visto que a literatura pertinente permite a classificação da cevada e da *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta última não-viva, fonte de j-glucana que será objeto de estudo deste trabalho, nesta categoria. Embora nenhum trabalho que detalhe este aspecto da cevada, *Saccharomyces cerevisiae* ou deste polissacarídeo tenha sido encontrado, a prática nutricional permite essa inferência (comunicação pessoal¹).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DA J-GLUCANA

Segundo Raymundo (2004) as maiores fontes de β -glucana são a aveia, cevada, e cogumelos como o *mitake* e o *shiitake*. Apesar destes alimentos não serem tão comuns na dieta dos brasileiros a sua introdução é possível. Os cogumelos, em especial, são característicos da culinária japonesa e possuem um alto custo o quê pode inviabilizar a sua utilização. No entanto, a cevada e a aveia possuem custos mais acessíveis e não necessariamente compõem pratos sofisticados.

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

As β -glucanas não são degradadas pelas enzimas humanas, o quê lhes confere propriedades de fibras alimentares. O maior interesse nestas fibras é devido ao seu

¹ Clisia Mara Carreira. Mestre em Nutrição Clínica em Doenças Tropicais pela Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Professora responsável pelas disciplinas de Fisiopatologia da Nutrição e Dietoterapia e Avaliação Nutricional do Centro

efeito protetor hipocolesterolêmico comprovado, reduzindo risco de doenças crônicas. A cevada contém altos níveis de fibras alimentares, principalmente β -glucanas que apesar de pouco consumida no Brasil, existem vários cultivares sendo desenvolvidos, os quais possuem características nutricionais desconhecidas e necessitam de estudos futuros (SOARES et al., 2000).

Apesar de evidências de atividades relacionadas ao consumo de β -glucana e outras fibras alimentares percebe-se que na verdade não são os compostos isolados e ingeridos sob a forma de suplementos que diminuem o risco de câncer, mas sim uma dieta rica em substâncias anticarcinogênicas, incluindo novos compostos recentemente isolados, que ainda se encontram em estudo. No entanto, o isolamento de compostos e os testes que avaliem a efetividade dos mesmos se faz necessário para que a comunidade científica possa prever seus efeitos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos.

As β -glucanas são polissacarídeos presentes na parede celular de alguns microrganismos, dentre eles as bactérias e fungos. Alguns cereais tais como a cevada e aveia são, também, ricos nesta substância. A extração de β -glucanas para a utilização terapêutica é geralmente feita a partir da levedura *Saccharomyces 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; TURNBULL et al., 1999; MASIHI, 2000).

A β -glucana é um dos componentes presentes em maior quantidade nas paredes celulares e constituem-se de 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). 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 et al., 1995). Outras β -glucanas que têm sua origem em cereais, como a cevada, são polissacarídeos de resíduos de glicose com ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4) (TOHAMY et al., 2003).

As β -glucanas 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 (PATCHEN; MAC VITTIE, 1983; SOLTYS et al., 1994; FALCH et al., 2000; TOKUNAKA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; KUBALA et al., 2003); sua eficiência está comprovada em infecções, tumores (MAEDA et al., 1996; KOGAN et al., 2002) e como estimulador da hematopoiese (PATCHEN; MAC VITTIE, 1985; HOFER; POSPISIL, 1997). 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), sendo considerada uma candidata promissora como agente imunoestimulatório para pacientes imunocomprometidos ou infectados com bactérias multidroga-resistentes.

Além das propriedades anteriormente descritas as β -glucanas despertam o interesse de pesquisadores na área de genética especialmente na subárea de mutagênese. 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 (SLAMENOVA et al., 2003), doxorubicina (LIN et al., 2004) e ciclofosfamida (CHORVATOVICOVA et al., 1996; CHORVATOVICOVA et al., 1998; TOHAMY et al., 2003).

Alguns tipos de β -glucanas já estão licenciados para o uso terapêutico no Japão e foram utilizadas como adjuvantes na terapia anti-tumoral (KANENO et al., 1989).

Estudos experimentais demonstraram que o lentinam pode ser protetor em infecções causadas por *Listeria*, *Mycobacterium tuberculosis* e vírus influenza (MASIHI, 2000).

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

A capacidade da β -glucana em induzir resistência inespecífica e específica em patologias infecciosas em camundongos foi analisada por Reynolds et al. (1980) e estes observaram que o pré-tratamento, mas não o pós-tratamento, determinava um aumento na sobrevivência de camundongos expostos ao vírus da encefalomielite equina venezuelana. Ainda dados deste mesmo grupo de pesquisadores demonstram que o pré-tratamento de

camundongos com β -glucana por via intravenosa determina aumento na resistência à exposição destes animais à cepa virulenta, *Francisella tularensis*, quando os resultados eram comparados com o protocolo onde os animais recebiam a glucana via intranasal. Mas, para os estudos com cepas de *Pseudomonas pseudomallei* estes resultados mostraram-se invertidos, ou seja, a via que demonstrou maior eficácia foi a intranasal. Este grupo ainda demonstrou que a vacina da encefalomielite eqüina venezuelana associada à β -glucana era mais protetora, para camundongos e macacos, do que a vacina sem adjuvante.

Meira et al. (1996) demonstraram que a associação de β -glucana a anti-fúngicos específicos no tratamento da paracoccidiodomicose possibilita uma melhor resposta à terapia devido ao efeito imunestimulador da glucana sobre o sistema imunológico. Segundo estes pesquisadores um grupo de nove pacientes em estágio avançado da doença foram tratados com anti-fúngico específico e nestes a β -glucana foi utilizada como imunestimulante. Os resultados deste grupo foram comparados com um outro grupo composto por oito pacientes que se encontrava em estágio da doença menos avançado e que receberam somente o anti-fúngico. A análise dos resultados clínicos permitiu verificar que dentre os primeiros pacientes apenas um apresentou recaída e no segundo grupo foram cinco casos. Valores da taxa de sedimentação de eritrocitos mostraram uma diferença significativa entre os pacientes do primeiro grupo quando foram comparados os níveis de pós e pré-tratamento. Verificou-se também a redução significativa de anticorpos séricos para *Paracoccidiodomicose brasiliensis* nos pacientes que se encontravam em estágio avançado da doença quando estes foram analisados no período pós-tratamento. O teste intradérmico com fitohemaglutinina mostrou aumento significativo de positividade entre pacientes do primeiro grupo quando comparados nas fases de pós- e pré-tratamento. Os níveis séricos de Fator de necrose tumoral α (TNF- α) também foram significativamente altos nos pacientes do primeiro grupo durante o tratamento.

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

comparação do número de larvas encontradas nos músculos dos animais demonstrou uma redução naqueles que receberam a β -glucana.

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

Estudos *in vivo* realizados por Chorvatovicová et al. (1996 e 1998), relatam a eficiência da β -glucana, de baixo peso molecular - $0,89 \times 10^5$, em prevenir os efeitos mutagênicos da ciclofosfamida. Em um dos estudos (CHORVATOVICOVÁ et al., 1996) os pesquisadores administraram duas doses de ciclofosfamida (80 mg/kg peso corpóreo, intraperitoneal - i.p.) com um intervalo de 24 horas. A β -glucana foi administrada em duas concentrações, 100,0 ou 200,0 mg/kg peso corpóreo, por duas vias: i.p. 24 horas antes da ciclofosfamida e intravenosa (i.v.) 1 e 2 horas anteriores às injeções do agente mutagênico. Outros dois grupos de animais foram tratados oralmente com a β -glucana na concentração de 100,0 mg/kg peso corpóreo anteriormente às administrações de ciclofosfamida. Os danos causados pelo agente mutagênico e os efeitos protetores da β -glucana foram analisados através do ensaio do micronúcleo realizado em células da medula óssea e observou-se que as três formas de administração da glucana (i.p., i.v. e v.o.) mostraram-se eficazes na prevenção dos efeitos clastogênicos da ciclofosfamida. Os autores relatam ainda que a ação protetora das vias intraperitoneal e intravenosa são dose-dependentes, logo, houve uma maior eficácia naqueles animais que receberam a maior dose (200,0 mg/kg peso corpóreo). No entanto, o efeito protetor foi observado, de modo significativo, em todos os grupos. Outro trabalho deste mesmo grupo (CHORVATOVICOVÁ et al., 1998) relata testes com uma outra β -glucana, também de baixo peso molecular - $0,19 \times 10^5$, onde se desenvolveu um protocolo muito semelhante ao anteriormente citado, excetuando o grupo que recebeu a glucana i.v. Neste

estudo os autores também relatam efeito antimutagênico da β -glucana tanto na administração v.o. quanto na i.p..

Os efeitos antigenotóxicos da glucana também foram demonstrados por Tohamy et al. (2003) em camundongos que receberam ciclofosfamida, doxorubicina e cisplatina. Estes estudiosos relatam que camundongos que receberam 2,5 mg/kg peso corpóreo de ciclofosfamida, 12,0 mg/kg peso corpóreo de doxorubicina 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 espermatogônias, respectivamente. Estes autores sugerem que o efeito protetor da β -glucana deve ser atribuído à sua capacidade de capturar os radicais livres produzidos quando da biotransformação destas três drogas antineoplásicas estudadas. O índice mitótico também foi estudado e este dado demonstrou que a β -glucana foi capaz de estimular a hematopoiese reestabelecendo a atividade mitótica das células da medula óssea uma vez que esta função havia sido suprimida pelas drogas.

Estudos *in vitro* de Slamenová et al. (2003) demonstraram que três diferentes glucanas (Carboxymethyl glucan - CM-G; Sulfoethyl glucan - SE-G; Carboxymethylchitin-glucan - CM-CG), foram eficientes em prevenir as lesões no DNA em cultura da linhagem de células pulmonares de hamster Chinês (V79) sendo a quantificação dos danos realizada através do ensaio do cometa. A maior eficiência foi demonstrada pela CM-CG, seguida pela SE-G e por fim a CM-G. Neste trabalho os autores relatam o efeito da β -glucana pela sua capacidade de reagir com os radicais OH liberados pela biotransformação do peróxido de hidrogênio.

1.3 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE

Os mesmos ensaios biológicos utilizados para determinação de substâncias com potencial mutagênico e/ou carcinogênico podem ser empregados para identificar agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos. A pesquisa por agentes que possam reduzir a frequência de alterações no DNA tem se mostrado promissora e com importantes implicações nas práticas terapêutica devido à possibilidade da redução da taxa de mutações e conseqüente redução na incidência de câncer.

Qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica. Posteriormente, as mesmas podem ser classificadas como bio-antimutagênicas ou desmutagênicas (GRÜTER et al., 1990; WATERS et al., 1990).

As substâncias bioantimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA. Agem em nível celular aumentando a fidelidade na replicação, estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro (HARTMAN; SHANKEL, 1990; DE FLORA, 1998; SIMIC et al., 1998).

Substâncias desmutagênicas são capazes de inativar um agente mutagênico e caracterizam-se pela atuação do composto diretamente no agente mutagênico, ou em seus precursores, inativando-os química ou enzimaticamente (KADA; SHIMOI, 1987; HARTMAN; SHANKEL, 1990; FERGUSON, 1994; DE FLORA, 1998).

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 denominados agentes de bloqueio; (III) a expressão de características malignas, também chamados de agentes supressores (KURODA; HARA, 1999).

O uso diário de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos, futuramente, será o procedimento mais efetivo para prevenir o câncer e as doenças genéticas humanas. Dentre as maneiras de prevenir ou reduzir a mutagênese pode-se citar os compostos químicos que agem no reparo de DNA ou no metabolismo do agente mutagênico, sendo, desse modo, antimutágenos efetivos. Estes compostos possuem efeitos frequentemente específicos para certas classes de mutágenos e/ou certos sistemas-teste (MALUF; ERDTMANN, 2003). Ao uso diário de produtos antimutagênicos ou anticancerígenos dá-se o nome de quimioprevenção (GOMES et al., 1996; SURH et al., 1996). Para a quimioprevenção faz-se necessário o uso de agentes quimiopreventivos, os quais devem apresentar as seguintes características: pouco ou nenhum efeito colateral, alta eficácia, possibilitar a administração por via oral, ter um mecanismo de ação conhecido e ser de baixo custo (FERGUSON, 1994).

Dentre os estudos da área de mutagênese o potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica, e então se deve observar uma redução das lesões produzidas no DNA (LUIZ, 2002).

A atividade antimutagênica foi demonstrada em frutas e vegetais (KADA et al., 1985). Várias substâncias obtidas a partir de fontes naturais são isoladas, identificadas e alguns dos mecanismos de sua atividade estão em fase de esclarecimentos. A N-acetil-I-cisteína, ácido p-aminobenzóico (PABA), isotiocianetos aromáticos, clorofilas e derivados, glutatona, vitamina C, vitamina E, vitamina A, flavonóides, ácidos graxos, fibras dietéticas são algumas das substâncias antimutagênicas conhecidas e encontradas na dieta (GEBHART, 1974; AMES, 1983; AMES, 1986; HARTMAN; SHANKEL, 1990; ODIN, 1997; LOHMAN et al., 2001).

Estudos epidemiológicos corroboram estes dados citados anteriormente, uma vez que há um grande volume de evidências associadas a dados obtidos a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, que apontam para a estreita relação entre constituintes da dieta e o risco de desenvolvimento de determinados tipos de cânceres. De modo geral, vegetais, frutas, fibras e alguns micronutrientes diminuem a incidência de câncer; enquanto gorduras, excesso de calorias e consumo de álcool aumentam o risco de desenvolvimento de patologias. Porém, o fato dos alimentos serem misturas complexas dificulta a interpretação dos resultados, assim como a interpretação das diferenças interindividuais ocorridas (ANDRADE et al., 2003). Mesmo assim, no setor alimentar, os cogumelos comestíveis são bastante pesquisados em relação à sua capacidade mutagênica, antimutagênica e antitumoral. Algumas espécies como o *Lentinula edodes*,

Craterellus cornucopioides, *Agaricus abruptibulbus*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius lilacinus*, *Lyophyllum connatum*, *Xerocomus chrysenteron* e o *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinemann) já demonstraram atividade antimutagênica (GRÜTER et al., 1991; LOHMAN et al., 2001; MENOLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BELLINI et al., 2003; LUIZ et al., 2003a; LUIZ et al., 2003b; GUTERREZ et al., 2004; BELLINI et al., 2005; MACHADO et al., 2005).

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

1.4 CULTURA DE CÉLULAS

Sistemas-teste de curta duração são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos ou antimutagênicos ambientais (KURODA et al., 1992). Dentre estes sistemas destacam-se as culturas de células de mamíferos *in vitro*, como a cultura de linfócitos humanos e as linhagens celulares provenientes de hamster Chinês (TAKAHASHI, 2003).

Estes sistemas-teste apresentam vantagens tais como: facilidade de padronização das condições experimentais como a densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo e outras; possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, além de serem ensaios econômicos e de boa reprodutibilidade; o material é relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; a organização dos cromossomos e do seu DNA é a mesma das células *in vivo* (RABELLO-GAY et al., 1991; RODRIGUES, 1991).

Nos testes realizados com células de mamíferos as células V79 e CHO-k1 são freqüentemente utilizadas. A avaliação dos danos causados por diferentes xenobióticos é feita principalmente através das técnicas de micronúcleo (JOHNSTON et al., 1997; MILLER et al., 1997; ALVES et al., 2000), cometa (OLIVE et al., 1992; KLAUDE et al., 1996; FRIEAUFF et al., 2001), alterações cromossômicas (SASAKI et al., 1994; MATSUOKA et al., 1997; ALVES et al., 2000) e trocas entre cromátides irmãs (CORTÉS et al., 1994). Estas células apresentam algumas vantagens como: facilidade de crescimento em cultivo; pequeno número de cromossomos; ciclo celular curto (10 a 12 horas) e fornecem uma alta freqüência de metáfases analisáveis. Porém algumas desvantagens também são encontradas: cariótipo variável (21 cromossomos \pm 1); geralmente formam populações celulares não sincrônicas; apresentam uma considerável heterogeneidade nos tempos de ciclo celular e são células transformadas (PRESTON et al., 1997).

A mutagênese também é estudada em células deficientes em mecanismos de reparo, como é o caso da mutante *xrs5* da linhagem CHO (SAKAMOTO-HOJO; TAKAHASHI, 1991; JOHNSTON et al., 1997). Esta célula apresenta deficiência na reunião de quebras de fita dupla, devido à não produção da proteína Ku80, envolvida no reparo de junções de extremidades não homólogas - Non-homologous end joining -NHEJ (JOHNSTON et al., 1998). Células mutantes deficientes em reparo de fita dupla são suscetíveis à radiação X, mas apresentam sensibilidade cruzada com a bleomicina e com agentes alquilantes. Estudos

citogenéticos demonstram que estas linhagens celulares apresentam uma maior quantidade de alterações cromossômicas espontâneas e a frequência de alterações induzidas por agentes, como o metilmetanosulfonato, é bem maior quando comparada com as linhagens selvagens, principalmente na frequência de quebras cromatídicas (STOPPER et al., 1997).

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

A maioria das linhagens celulares utilizadas em ensaios *in vitro* não tem capacidade de metabolização de drogas, havendo a necessidade, portanto, da adição de sistemas endógenos de metabolização, como a S9 (fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254) (GALLOWAY et al., 1994 apud TAKAHASHI, 2003; PRESTON, 1997). No entanto, algumas linhagens como a CRO22-HTC (hepatoma de ratos) são células metabolizadoras e as suas culturas são padronizadas em protocolos experimentais.

1.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

1.5.1 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

O teste de micronúcleo *in vitro* evoluiu rapidamente na área de genética toxicológica por ser um método simples e útil na avaliação de vários tipos de danos citogenéticos. O teste do micronúcleo sofreu várias modificações inovadoras em seu protocolo e este fato aponta para uma ampliação da sua aplicabilidade (SALVADORI et al., 2003).

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

Os micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma. Aparecem na telófase e são resultados de fragmentos acêntricos, originados de quebra isocromatídica ou cromatídica, ou de disfunções no fuso mitótico que leva à formação de micronúcleos que contem cromossomos inteiros. Desta forma, podem ser gerados por agentes clastogênicos ou aneugênicos. Pode haver um ou mais por célula, e tais corpúsculos não devem apresentar qualquer conexão estrutural com o núcleo principal (RABELLO-GAY et al., 1991; MERSCH et al., 1996; KRISCH-VOLDERS; FENECH, 2001).

A aplicação do bloqueio da citocinese, com a citocalasina-B, permite identificar células que tenham passado por um ciclo de mitose após o tratamento *in vitro*. Esta variação técnica transformou o teste do micronúcleo em uma ferramenta útil na triagem de danos genéticos (FENECH; MORLEY, 1985). A citocalasina-B é um potente inibidor dos microfilamentos de actina, impedindo a polimerização dos mesmos na placa equatorial formada no final da telófase, desta forma observa-se uma cariocinese com ausência de citocinese.

1.5.2 Ensaio do Cometa

O teste do cometa visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a cometas. Os primeiros pesquisadores que utilizavam a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydenberg e Johanson em 1978. Östling & Johanson em 1984 incluíram no teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), o que permitiu um aumento quanto à sensibilidade do teste (apud TICE, 1995). A eletroforese em pH alcalino (pH > 13) foi introduzida por Singh et al. (1988) e transformou o ensaio do cometa em uma técnica de grande importância na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios álcali-lábies, *in vivo* e *in vitro*.

A técnica do cometa é um método rápido, simples e sensível para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células, sendo particularmente importante na detecção de diferenças intercelulares, quanto aos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer célula eucariótica onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo com uma amostragem bastante pequena. Além disso, os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade

do teste do ensaio cometa em detectar danos em células individuais é comparável a outros métodos que avaliam danos em uma população de células (OLIVE et al., 1992; FAIRBAIRN et al., 1995; RIBAS, 1995; ROSS et al., 1995; TICE, 1995; KLAUDE et al., 1996; ANDERSON et al., 1998; TICE et al., 2000; FRIEAUFF et al., 2001).

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

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

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente (KOBAYASHI, 1995), utilizando-se coloração com um agente intercalante fluorescente: o Brometo de Etídio, e um microscópio de fluorescência. Desta forma os cometas poderão ser classificados em: classe 0 - nucleóides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 - nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 - nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 - nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (SPEIT et al., 1996).

1.5.3 Ensaio de Viabilidade Celular

A técnica para avaliação da viabilidade celular descrita por McGahon et al. (1995), emprega uma coloração diferencial com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio para a determinação de células viáveis e inviáveis.

A utilização destes dois corantes anteriormente citados permite a identificação de células em apoptose, tanto no estágio inicial como final, com base na integridade da membrana plasmática.

Quando o Laranja de Acridina se intercala no DNA, proporciona coloração verde sob microscopia de fluorescência. Este corante também se liga ao RNA, mas como não se intercala, o RNA é corado em vermelho-alaranjado. Assim, uma célula viável apresenta um núcleo esverdeado e um citoplasma vermelho. O Brometo de Etídio penetra somente em células mortas. Este corante também se intercala no DNA, dando uma aparência alaranjada, mas se liga fracamente ao RNA, o qual pode aparecer ligeiramente vermelho (POERSCH, 2005).

Assim, células vivas com membrana funcional têm uma coloração verde uniforme em seu núcleo. Células em apoptose inicial com membrana funcional, mas com fragmentação de seu DNA, mostram uma coloração verde no núcleo e citoplasma, sendo visível uma marginalização do seu conteúdo nuclear. Células em apoptose final apresentam áreas coradas em alaranjado tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distingue de células necróticas, que têm uma coloração alaranjada uniforme no núcleo (POERSCH, 2005).

1.6 SISTEMAS-TESTE *IN VIVO*

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

eficiente na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos, apesar dos experimentos com animais vivos reproduzirem com maior semelhança as condições humanas (KURODA et al., 1992).

Além das adversidades anteriormente mencionadas o resultado positivo *in vitro* não é garantia da positividade *in vivo*, mas serve como uma alerta da periculosidade do xenobiótico testado. O sistema *in vitro* é de grande importância por fornecer dados fundamentais sobre a ação de substâncias testadas, como clastogênica, aneugênica, ação direta ou indireta sobre o DNA e nível de toxicidade (TAKAHASHI, 2003).

Para se identificar a carcinogenicidade de substâncias químicas, *in vivo*, há dois tipos básicos de estudo: os co-epidemiológicos, que enfocam populações humanas e os experimentais, que se utilizam particularmente de roedores (IARC, 1986; IARC, 1987; HUFF et al., 1991; CAMARGO, 1994). Os dois tipos de estudo caracterizam-se por ter como parâmetro final de análise o desenvolvimento do câncer propriamente dito. No entanto, quando estudos clínicos identificam um agente cancerígeno, o pior já aconteceu, ou seja, os grupos humanos estudados já foram atingidos pelo efeito nocivo do xenobiótico. Assim, os estudos experimentais com roedores são os verdadeiros testes prospectivos, aos quais os agentes químicos devem ser submetidos antes de serem utilizados em qualquer atividade humana. Existem outros testes, que podem sugerir o potencial cancerígeno de um composto, como os testes de mutagenicidade (ZEIGER, 1987; ISHIDATE et al., 1988; ASHBY; TENNANT, 1991; RABELLO-GAY, 1991). Porém, o quê estes testes de fato analisam é a genotoxicidade do agente, ou seja, sua toxicidade aos cromossomos ou ao DNA. Estes ensaios são aceitos como preditivos de carcinogenicidade devido à íntima relação que existe entre os potenciais mutagênicos e cancerígenos dos compostos químicos (CAMARGO et al., 1994).

Dentre os testes experimentais *in vivo*, utilizando roedores, mais aceitos por agências internacionais para prever carcinogenicidade de um produto tem-se os testes: (I) longa duração *in vivo* para detecção de cancerígenos; (II) carcinogênese de múltiplas etapas e cancerígenos químicos; (III) média duração *in vivo* para detecção de cancerígenos, (IV) média duração *in vivo* para detecção da carcinogenicidade em múltiplos órgãos (CAMARGO et al., 1994).

No entanto, na referida pesquisa somente foram utilizados testes que avaliam genotoxicidade e teratogenicidade.

1.6.1 Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

Micronúcleos são freqüentemente usados para quantificar a exposição a agentes químicos ou físicos (TUCKER; PRESTON, 1996), sendo um procedimento importante e sugerido, por agências de pesquisa da área de genética toxicológica, na avaliação da capacidade cancerígena de um composto (KRISHNA et al., 2000).

Para a realização do teste do micronúcleo *in vivo* os tipos celulares mais utilizados são as células do sistema hematopoiético, isto é, linfócitos periféricos e eritrócitos (TUCKER; PRESTON, 1996).

Uma técnica amplamente utilizada é aquela que utiliza preparações a partir de medula óssea. De acordo com Schmid (1975) sugere-se que os micronúcleos sejam avaliados em hemáceas jovens, pois quando os eritroblastos expõem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma, onde são facilmente identificados devido à sua morfologia arredondada e coloração características. No entanto, Hayashi et al. (1990) descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico pela coloração com Laranja de Acridina. Este corante ao se intercalar com moléculas de DNA e após ser submetido à radiação ultra-violeta emite uma fluorescência de cor amarela. Já quando se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar, a fluorescência emitida é vermelha. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Os micronúcleos que por sua vez possuem DNA em sua constituição coram-se em amarelo e se encontram no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho.

De acordo com Kishi et al. (1992), estudos comparativos entre a técnica convencional, em medula óssea, corada por Giemsa, e a técnica que utiliza pré-coloração com Laranja de Acridina demonstram uma boa correlação. Logo ambas as técnicas mostram-se adequadas para este tipo de avaliação. Porém, a técnica de sangue periférico apresenta uma vantagem: um mesmo animal poder fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de sacrifício do mesmo (CSGMT, 1992). Este fato permite que o perfil da freqüência de micronúcleos possa ser avaliado para um mesmo animal ao longo de um tratamento agudo, subcrônico e crônico, além de possibilitar o estudo da recuperação deste mesmo indivíduo após a suspensão das administrações das drogas-teste. Em geral o modelo experimental mais utilizado para avaliação de micronúcleos em sangue periférico é o camundongo visto que o

baço de ratos e seres humanos, principalmente, possui a propriedade de sequestrar células micronucleadas da corrente sanguínea.

1.6.2 Ensaio de Teratogenicidade

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

Os fatores genéticos constituem a causa mais comum de malformações congênitas, sendo responsáveis por cerca de um terço dos casos na espécie humana (MOORE; PERSAUD, 2004). Estimativas da incidência das causas de malformações congênitas primárias destacam as aberrações cromossômicas como responsáveis por 67%; genes mutantes por 7-8%; fatores ambientais por 7-10%; herança multifatorial por 20-25%; e 50-60% de etiologia desconhecida (CONNOR; FERGUSON-SMITH, 1987; PERSAUD, 1990; THOMPSON et al., 1991). No entanto, é provável que a maioria das crianças com malformações congênitas de etiologia desconhecida tenha algum distúrbio genético (MOORE & PERSAUD, 2004). Assim, percebe-se que é cada vez mais importante desenvolver e/ou utilizar sistemas-teste que possibilitem a avaliação de substâncias com potencial teratogênico, bem como aquelas que são capazes de prevenir o desenvolvimento adverso da prole de mamíferos por possuírem capacidade de prevenir danos no DNA.

1.6.2.1 Obtenção dos Fetos e Avaliação da Performance Reprodutiva

Para a obtenção dos fetos e avaliação dos defeitos estruturais e perdas gestacionais a gravidez deve ser interrompida no décimo sétimo dia de gestação, em camundongos. Assim, realizar-se-á a pesagem, e a laparotomia, uma vez que recém-nascidos malformados, ou com pouca viabilidade, são freqüentemente canibalizados pelas genitoras. As vísceras maternas são analisadas, durante a laparotomia, para possível detecção de

anormalidades macroscópicas. Em seguida, faz-se a histerectomia e posteriormente a onfalectomia (OLIVEIRA, 2001).

Frente a estes procedimentos são registrados os seguintes dados: número de sítios de implantação, presença de reabsorções precoces ou tardias, número de fetos vivos e mortos, peso do útero com fetos, peso de cada feto, pesos placentários, dentre outros. A partir destes dados calcula-se os parâmetros relativos à performance reprodutiva: taxa de perdas pós-implantação, taxa de reabsorção, índice placentário, adequação da idade materna ao tempo de gestação e outros (OLIVEIRA, 2001).

1.6.2.2 Exame dos Fetos para a Detecção de Anormalidades Externas, Viscerais e Esqueléticas

Os fetos, depois de retirados do útero, são inspecionados sistematicamente, para certificar de que estejam vivos ou mortos e para a verificação de possíveis anomalias estruturais externas. Em seguida, as malformações devem ser classificadas e para isso os estudos de Taylor (1986) são vastamente utilizados por pesquisadores da área.

Após a classificação das anormalidades estruturais externas a prole é dividida em duas metades, sendo uma delas destinada à análise visceral e a outra à análise esquelética.

Trabalhos clássicos orientam estas análises em teratogênese. Para a visceral faz-se, geralmente, a combinação de cortes/microdissecção propostos por Barrow e Taylor (1969) para o estudo de tórax e abdômen, e cortes estratégicos propostos por Wilson (1965) para o estudo da cabeça. A classificação das anomalias viscerais geralmente é baseada, principalmente, nos trabalhos de Taylor (1986) e Manson e Kang (1994).

Para a análise esquelética os fetos são preparados pelo método de diafanização e coloração de alizarina (coloração de ossos), segundo os procedimentos descritos por Kochhar (1973). Os fetos após diafanizados são avaliados e classificados segundo as descrições de Taylor (1986).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar o mecanismo de ação e possíveis efeitos mutagênicos, genotóxicos e protetores de danos no DNA do polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro* e *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os potenciais genotóxico e antigenotóxico do polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro*.

Avaliar os potenciais mutagênico e antimutagênico do polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro* e *in vivo*.

Investigar o mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana, de duas diferentes origens, cevada e *Saccharomyces cerevisiae*, através da utilização de metodologias *in vitro* pelo teste do micronúcleo.

Estudar a interferência da metabolização na investigação do mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana em testes *in vitro* com as linhagens celulares CHO-k1 e HTC.

Estudar a interferência da metabolização no efeito quimioprotetor, do polissacarídeo β -glucana, em testes *in vitro* com as linhagens celulares CHO-k1 e HTC.

Estudar o mecanismo de ação por bioantimutagênese do polissacarídeo β -glucana através de teste *in vitro* com linhagem celular deficiente em reparo (CHO-xrs5).

Estudar o efeito citotóxico do polissacarídeo β -glucana e sua capacidade de prevenir eventos apoptóticos e necróticos através do teste de viabilidade celular *in vitro*.

Avaliar a capacidade do polissacarídeo β -glucana de interferir no desempenho reprodutivo de fêmeas de camundongos *Swiss* (*Mus musculus*).

Investigar a capacidade do polissacarídeo β -glucana de causar desenvolvimento adverso na prole de fêmeas de camundongos *Swiss* (*Mus musculus*).

Avaliar a capacidade do polissacarídeo β -glucana em melhorar o desempenho reprodutivo de fêmeas de camundongos *Swiss (Mus musculus)*.

Investigar a capacidade do polissacarídeo β -glucana de prevenir efeitos teratogênicos na prole de fêmeas de camundongos *Swiss (Mus musculus)*.

Verificar se fêmeas grávidas de camundongos *Swiss (Mus musculus)* possuem susceptibilidade diferenciada a danos mutagênicos causados por ciclofosfamida e/ou possui resposta diferenciada à capacidade da β -glucana em prevenir os mesmos.

**Avaliação da atividade antimutagênica do polissacarídeo β -
Glucana, extraída da cevada, no ensaio do micronúcleo nas
linhagens celulares CHO-k1 e HTC**

Artigo a ser submetido à Revista *Cell Biology and Toxicology*

Avaliação da atividade antimutagênica do polissacarídeo β -glucana, extraída da cevada,
no ensaio do micronúcleo nas linhagens celulares CHO-k1 e HTC

Rodrigo Juliano Oliveira¹, Lúcia Regina Ribeiro², Ariane Fernanda da Silva¹, Renata
Matuo¹, Mário Sérgio Mantovani^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina
(PR), Brasil

²Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio
Claro (SP), Brasil

*Autor correspondente:

Telefone: +55 43-3371 4417; Fax: +55 43-3371 4527

e-mail: biomsm@uel.br

Resumo

Diante da necessidade de identificação de novos agentes antimutagênicos e da determinação do mecanismo de ação dos mesmos, o presente trabalho avaliou o mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana em teste de antimutagenicidade, através do ensaio do micronúcleo, nas linhagens celulares não metabolizadora, CHO-k1, e metabolizadora, HTC. Os experimentos de mutagenicidade foram realizados com três diferentes doses de β -glucana (5,0, 10,0 e 20,0 μ g/mL) sendo que somente a maior dose apresentou atividade mutagênica. Nos experimentos de antimutagenicidade fez-se a associação das mesmas doses de β -glucana com dois agentes mutagênicos, metilmetanosulfonato e 2-aminoantraceno, em quatro diferentes protocolos: pré-tratamento, tratamento simultâneo (simples e com pré-incubação) e pós-tratamento. Os resultados indicaram que o polissacarídeo β -glucana possui capacidade quimiopreventiva para os dois tipos celulares e que o protocolo de tratamento simultâneo simples apresentou uma melhor eficiência. A avaliação dos diferentes protocolos e das porcentagens de redução de danos permite sugerir que a β -glucana possui atividade tanto desmutagênica como bioantimutagênica, sendo esta última de menor eficiência. Faz-se necessário ainda relatar que a eficiência e determinação do mecanismo de ação estão sujeitas a variações quando comparadas as duas linhagens celulares visto que em HTC, sistema metabolizador, o polissacarídeo em estudo tem sua eficiência quimiopreventiva diminuída o quê pode levar a conclusões errôneas a respeito de seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: β -glucana, células HTC, células CHO-k1, mecanismo de ação, antimutagênese

1. Introdução

O grande número de substâncias que atualmente contaminam o ambiente são advindas de ações antropogênicas. Desta forma, verifica-se um aumento crescente de resíduos industriais, agronômicos, domésticos e urbanos decorrentes do desenvolvimento das sociedades modernas. Compostos químicos, físicos e poluição, principalmente, apresentam-se como riscos potenciais para a saúde humana e por isso despertam a atenção de diferentes áreas de pesquisa.

Diversos estudos demonstram uma associação inversamente proporcional entre o consumo de verduras e frutas e o desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer (Ferguson, 1994; Flagg et al., 1995)

Dentre os alimentos que podem compor uma dieta balanceada e que possuem a capacidade de prevenir o desenvolvimento de câncer estão os alimentos funcionais. O conceito desses provém da hipótese de que a dieta alimentar possa controlar e modular várias funções orgânicas, contribuindo para a manutenção da saúde e reduzindo o risco do aparecimento de patologias (Borges, 2001).

Para que um alimento seja classificado como funcional, ele deve exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças; fazer parte da alimentação usual; possuir efeitos positivos obtidos através de quantidades não tóxicas que devem persistir mesmo após a suspensão da ingestão e não devem ser utilizados com o intuito de tratar ou curar doenças (Milner, 1999).

Os alimentos funcionais do tipo prebióticos são aqueles que não sofrem hidrólise ou absorção no intestino delgado; quando atingem o cólon, devem ser metabolizados seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas e devem ser capazes de induzir efeito fisiológico que seja importante para a saúde (Gibson, 1999). As fibras

alimentares, em geral, se enquadram nessa descrição assim como a cevada da qual se originou a β -glucana que é objeto de estudo desta pesquisa.

As glucanas são polissacarídeos formados por um esqueleto 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). A β -glucana, extraída de cevada, é um polissacarídeo de resíduos de glicose com ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4) (Tohamy et al., 2003).

Dentre os marcadores biológicos das glucanas pode-se citar a estimulação do sistema imune frente às infecções bacterianas (Tzianabos and Cisneros, 1996), virais (Reynolds et al., 1980), fúngicas (Meira et al., 1996) e parasitárias (Holbrook et al., 1981); modulação da imunidade humoral e celular (Falch et al., 2000); estimulação da hematopoiese (Hofer and Pospisil, 1997); ativação de macrófagos (Tsiapali et al., 2001) e neutrófilos (Rankin et al., 1990).

Além destes, estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstram sua eficácia 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 (Tohamy et al., 2003). No entanto, faz-se ainda necessários novos estudos para uma melhor compreensão do mecanismo de ação deste polissacarídeo. Frente a este fato, o presente trabalho investigou o mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana, originária da cevada, em teste de antimutagenicidade utilizando o ensaio do micronúcleo na presença e ausência de metabolização, nas linhagens celulares HTC e CHO-k1, respectivamente.

2. Material e Métodos

2.1. Agentes Químicos

Para a indução de danos no DNA na linhagem celular CHO-k1, utilizou-se o agente alquilante, de ação direta, metilmetanosulfonato – MMS (Merck), na concentração final de 37,6µg/mL. Em HTC utilizou-se a mesma concentração de MMS e um segundo agente, de ação indireta, 2-aminoantraceno – 2AA (Acros), na concentração final de 1,0µg/mL.

A β-D-Glucana (Sigma) originária da cevada, foi testada nas concentrações de 5, 10 e 20µg/mL de meio de cultura, denominadas β₁, β₂ e β₃, respectivamente.

2.2. Linhagens Celulares

A linhagem celular de ovário de hamster Chinês, CHO-k1 (selvagem), utilizada nesse estudo foi fornecida pelo Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo – USP, pela Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi. A linhagem celular de tecido de hepatoma de *Rattus norvegicus*, HTC, foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). 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, em frasco de 25cm², em concentração inicial de 1,0 x 10⁶ células. Nestas condições, o tempo de ciclo celular é de aproximadamente 12 e 24 horas para CHO-k1 e HTC, respectivamente.

2.3. Teste de Micronúcleo em Células Binucleadas

Na avaliação da mutagenicidade, para as duas linhagens celulares, as células foram cultivadas por dois ciclos completos (24 horas para CHO-k1 e 48 horas para HTC). Fez-se a lavagem das culturas, por 2 vezes, com PBS. A seguir acrescentou-se 5,0 mL de meio de cultura, livre de soro bovino fetal, ao qual foram adicionadas as substâncias testes em tratamento de pulso de 3 horas. Nesse experimento, fez-se os seguintes tratamentos: a. Controle; b. Agente Indutor de Danos – MMS; c – Agente Indutor de Danos – 2AA; d., e., f. β -Glucana em três diferentes concentrações (β_1 – 5,0 μ g/mL; β_2 – 10,0 μ g/mL; β_3 – 20,0 μ g/mL). Ao término deste período, as culturas foram novamente lavadas com PBS, por 2 vezes; acrescentou-se então 5,0 mL de meio de cultura completo, seguido de citocalasina-B (Cyt-B – Sigma) na concentração de 3,0 μ g/mL por 17 horas para a linhagem celular CHO-k1 e 30 horas para HTC. O agente indutor de danos 2AA somente foi utilizado em cultura de células HTC, visto que este precisa ser metabolizado para causar danos ao DNA.

Para a antimutagenicidade realizou-se os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo (simples e com pré-incubação) e pós-tratamento. Para todos os protocolos estabeleceu-se os seguintes tratamentos: a. Controle; b. Agente Indutor de Danos – MMS; c. Agente Indutor de Danos – 2AA; d. MMS + β -glucanas; e. 2AA + β -glucanas. Assim como nos experimentos de mutagenicidade, a indução de danos foi sempre feita em meio de cultura livre de soro bovino fetal e as lavagens foram realizadas com PBS, por 2 vezes, antes e depois da indução de danos. A concentração de citocalasina-B foi mantida. Os experimentos com células CHO-k1 e HTC totalizaram um período de 44 e 81 horas de cultura, respectivamente; divididos das seguintes formas:

(I) Pré-tratamento – as células CHO-k1 foram cultivadas por 7 horas, em seguida acrescentaram-se as β -glucanas ao meio de cultivo por outras 17 horas. Após este período as culturas foram lavadas, acrescentou-se meio de cultivo livre de soro bovino fetal e procedeu-se o tratamento de pulso (3 horas) com MMS. As culturas foram lavadas novamente e acrescentou-se meio de cultura completo e citocalasina-B permanecendo por outras 17 horas. Para as células HTC procedeu-se da mesma forma sendo alterados somente os tempos e foi acrescido o agente indutor de danos 2AA. Desta forma, as células foram cultivadas por 18 horas, o pré-tratamento se deu por 30 horas. A indução de danos se fez em tratamento de pulso com MMS e 2AA (3 horas) e as culturas continuaram em crescimento por 30 horas com citocalasina-B;

(II) Simultâneo – as células foram cultivadas por dois ciclos completos (24 horas para CHO-k1 e 48 horas para HTC). Fez-se a lavagem das culturas com PBS. A seguir acrescentou-se meio de cultura, livre de soro bovino fetal, ao qual foram adicionados os agentes indutores de danos (MMS ou 2AA) associados com as β -glucanas, em tratamento de pulso (3 horas). Ao término deste período as culturas foram novamente lavadas e acrescentou-se, novamente, meio de cultura completo mais citocalasina-B por 17 horas para a linhagem celular CHO-k1 e 30 horas para HTC;

(III) Simultâneo com pré-incubação – para esta fase do experimento procedeu-se como descrito no item anterior. No entanto, os volumes a serem transferidos para as culturas foram pré-incubados por 1 hora em estufa do tipo BOD a 37°C;

(IV) Pós-tratamento – as células foram cultivadas por dois ciclos completos. Procedeu-se a lavagem e indução de danos em tratamento de pulso (3 horas) com MMS e 2AA, em meio de cultura livre de soro bovino fetal. Após este período as células foram lavadas e juntamente com o meio de cultura completo e a citocalasina-B

acrescentou-se as β -glucanas por um período de 17 e 30 horas para CHO-k1 e HTC, respectivamente.

A colheita foi realizada transferindo-se o meio de cultura para um tubo cônico de centrífuga. Em seguida lavou-se as culturas, 2 vezes com 5,0 mL de PBS, sendo os primeiros 5,0 mL de PBS reservados junto ao meio de cultivo e o segundo desprezado. Tripsinizou-se as células com 500,0 μ L de Tripsina-EDTA (0,025%) por um tempo máximo de 2 minutos. A ação da tripsina foi inativada com adição de meio de cultura anteriormente reservado. A solução foi centrifugada, por 5 minutos, a 26226,5g. Retirou-se o sobrenadante deixando no tubo somente 1,5mL aos quais acrescentou-se 1,5 mL de citrato de sódio (1%) e uma gota de formaldeído a 40%. Ressuspendeu-se o *pellet* e centrifugou-se novamente nas mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 5,0 mL de fixador metanol-ácido acético (3:1). O *pellet* foi novamente ressuspendido e a solução centrifugada. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se cerca de 0,5 mL de fixador e homogeneizou-se. Esta solução foi utilizada para a preparação das lâminas. As lâminas utilizadas para a montagem foram previamente lavadas e mantidas em água destilada à 4°C. A solução foi pingada em lâminas contendo um filme de água, em seguidas foram secas ao ar livre e posteriormente coradas com Giemsa 5%.

2.4. Análises das Lâminas e Estatística

Foram realizadas três repetições independentes para cada tratamento, em cada teste. Os critérios para seleção de células binucleadas foram: (I) limites nucleares distinguíveis ao microscópio óptico; (II) núcleos com tamanhos semelhantes, coloração padrão e de mesma intensidade; (III) núcleos principais podendo estar próximos, mas

não sobrepostos e bem delimitados; (IV) limites citoplasmáticos distinguíveis das células adjacentes. O micronúcleo, por sua vez, presente nas células binucleadas, não deveria ter tamanho superior a 1/3 dos núcleos principais além de possuir coloração padrão e não ser refringente.

Analisou-se 6000 células binucleadas por tratamento, sendo 2000/tratamento/repetição e a análise estatística foi realizada usando o teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

A porcentagem de redução dos danos do agente mutagênico pela β -glucana foi calculada através do número de células com danos observados com os agentes indutores de danos (MMS ou 2AA) menos o número de células com danos observados no tratamento de antigenotoxicidade x 100, dividido pelo número de células com danos observado com o agente indutor de dano menos o número de células com danos do controle.

3. Resultados

A Tabela 01 apresenta a frequência, número máximo e mínimo, média e desvio padrão referentes ao ensaio do micronúcleo, na avaliação da mutagenicidade. A análise estatística demonstrou que, tanto para a linhagem celular CHO-k1 como para HTC, a β_3 mostrou-se mutagênica, diferentemente das duas menores doses avaliadas (β_1 e β_2).

As Tabelas 02 a 05 contêm os dados referentes aos experimentos de antimutagenicidade nos quatro diferentes protocolos (pré-tratamento, simultâneo simples, simultâneo com pré-incubação e pós-tratamento). As tabelas apresentam a frequência, número mínimo e máximo, média, desvio padrão de micronúcleos e porcentagem de redução de danos obtidas.

No protocolo de pré-tratamento (Tabela 02), as associações demonstraram eficiência para as três diferentes doses de β -glucanas testadas em CHO-k1 em relação ao MMS. No entanto, em HTC, o mesmo não foi verificado. Os danos causados pelo MMS somente foram prevenidos pela dose mais alta (β_3). Para o agente de ação indireta somente a menor dose (β_1) não foi eficiente na prevenção.

O tratamento simultâneo simples (Tabela 03) demonstrou diferenças estatisticamente significativas para todas as associações realizadas. A dose mais eficiente em CHO-k1 foi a β_3 . No entanto, quando o mesmo experimento foi realizado com HTC a β_1 foi a que demonstrou uma melhor eficácia. Com o agente de ação indireta, em HTC, verificou-se que a β_3 foi a mais eficiente.

No tratamento simultâneo com pré-incubação (Tabela 04) a β_2 mostrou-se a mais eficiente para o agente indutor de danos de ação direta (MMS), em ambas as células. No entanto, para o agente indireto (2AA), em HTC, β_1 e β_2 apresentaram praticamente a mesma eficiência e β_3 uma melhor capacidade protetora.

O pós-tratamento (Tabela 05) demonstrou que β_2 e β_3 foram eficientes na prevenção de danos causados pelo MMS em CHO-k1 e somente a β_3 foi eficiente em HTC. Em relação ao 2AA nenhuma β -glucana foi eficiente em prevenir os danos.

Verifica-se assim que o protocolo de tratamento simultâneo simples apresentou maior eficiência quimiopreventiva quando comparado aos demais. Este fato indicou a necessidade de conhecer qual a porcentagem de incremento ou decréscimo desta taxa (Tabela 06). Os cálculos foram feitos dividindo a porcentagem de redução para as diferentes glucanas no protocolo simultâneo pelos correspondentes tratamentos nos demais protocolos x 100 e o valor encontrado foi subtraído de 100.

4. Discussão

Metodologias *in vitro* são adequadas para a verificação de mecanismos de ação, além de oferecer uma melhor padronização das etapas experimentais bem como, possibilitar a manipulação ou introdução de variáveis desejadas, como tempo de tratamento, tipos de associações e outros. Dentre as metodologias *in vitro* a utilização de células de mamíferos pode permitir a correlação com possíveis efeitos em seres humanos (Brusick, 1987).

Atualmente existe o interesse na identificação de substâncias presentes no meio que possuem atividade protetora contra mutações, a fim de resguardar as gerações futuras. Neste estudo foram obtidos dados com diferentes protocolos de indução de danos ao DNA e quimioproteção, verificando a frequência de micronúcleos, frente a dois agentes alquilantes e suas associações com a β -glucana de cevada, em três diferentes concentrações.

A avaliação da mutagenicidade das três diferentes doses de β -glucana permitiu verificar que somente o tratamento com a dose mais alta (β_3) apresentou aumento no número de micronúcleos nos dois tipos celulares. Este achado, em uma primeira análise, indica a exclusão desta ou de doses mais altas em futuros estudos que utilizem sistemas de cultura com as linhagens celulares CHO-k1 e HTC, podendo sugerir algum tipo de toxicidade. No entanto, é necessária uma avaliação biológica mais criteriosa desta informação, uma vez que se verifica que a média de micronúcleos encontrada para os controles foi muito baixa podendo assim interferir na análise estatística. Além disso, em outros trabalhos (Bellini et al., 2005) foi possível encontrar valores de micronúcleos em tratamentos controles bastante semelhantes ao encontrado em nossos tratamentos com β_3 . A β -glucana também poderia ter como efeito protetor o aumento da viabilidade celular por impedir a ocorrência de eventos apoptóticos. Assim, acredita-se que devido a

este efeito biológico uma cultura tratada pelo polissacarídeo em estudo poderia apresentar uma maior frequência de micronúcleos não por este ser mutagênico, mas pela sua capacidade de aumentar a viabilidade celular o que indica a preservação inclusive de células com danos genéticos que podem ser verificados através do teste do micronúcleo (dados não publicados).

Segundo Fenech et al. (1999) os eventos de apoptose atuam na eliminação de células micronucleadas, reduzindo, portanto, a frequência de células com danos clastogênicos. Vukicevic et al. (2004) por sua vez apresentam duas considerações distintas entre si a este respeito. Na primeira delas os autores dizem que uma alta frequência de células em apoptose pode relacionar-se a outros danos genéticos que não resultariam na formação de micronúcleos, e assim não elevariam a sua frequência. Por outro lado, um aumento na frequência de micronúcleos e índices de apoptose normais poderiam ser explicados pela indução de supressão apoptótica nas células micronucleadas, tornando-se estas necróticas antes mesmo de passarem pela mitose.

O protocolo de pré-tratamento demonstrou eficiência para as três diferentes doses em CHO-k1. Já em HTC a eficácia foi verificada somente na maior dose. Este fato pode sugerir que a exposição da β -glucana ao sistema de cultura metabolizadora, por um tempo mais longo (30 horas), possa ter propiciado degradação da estrutura do polissacarídeo o que viria diminuir a sua eficiência no controle de eventos que danificariam o DNA. Quando são analisados os resultados com o agente de danos indireto, 2AA, verifica-se que somente a menor dose não apresentou eficácia. Este fato pode permitir supor que apesar da constante metabolização que a β -glucana estava exposta ainda havia quantidade de polissacarídeos suficientes, no meio intracelular, nas duas maiores concentrações, para reagir com os metabólitos que estavam sendo

formados pela degradação do 2AA, os quais seriam os responsáveis pelas alterações nas moléculas de DNA.

No protocolo de tratamento simultâneo simples verificou-se que todas as associações realizadas foram eficientes na quimioprevenção. A porcentagem de redução de danos foi aumentada em relação ao protocolo de pré-tratamento e este fato pode sugerir que a interação entre os agentes causadores de danos e quimiopreventivos possam se iniciar ainda no meio extracelular. Desta forma, uma possível inativação do MMS ou 2AA no meio extracelular induziria uma menor eficácia na produção de danos no DNA. Além desta possibilidade pode-se pensar que a interiorização dos agentes químicos, mutagênicos e antimutagênicos, aconteceram ao mesmo tempo e este fato propiciaria uma melhor capacidade de interação destes neste novo ambiente.

O protocolo de tratamento simultâneo com pré-incubação em CHO-k1 apresentou uma redução de danos mais alta quando comparada ao protocolo simultâneo simples. Este fato indicaria que as moléculas de MMS poderiam ter sido inativadas de forma ainda mais eficiente no momento de pré-incubação, sugerindo que a complexação do agente indutor com o polissacarídeo de β -glucana é uma ação eficaz na prevenção de danos, em apoio à hipótese anterior. No entanto, quando esta mesma pré-incubação foi realizada e tratou-se as culturas de células HTC a eficiência apresentou uma redução expressiva em relação ao tipo celular CHO-k1. Nenhuma menção a este fato foi encontrada na literatura consultada. Mas, uma suposição plausível seria que a metabolização dos compostos formados pela interação MMS+ β -glucana ou 2AA+ β -glucana teria produzido compostos capazes de induzir danos no DNA, os quais potencializariam os efeitos dos agentes mutagênicos, e que não foram eficientemente impedidos de agir pelas glucanas que ainda estavam livres na solução ou no meio intracelular. Outra hipótese seria que os metabólitos produzidos a partir dos agentes

indutores de danos complexados com a β -glucana seriam incapazes de promover a atividade antimutagênica. Necessita-se ainda pensar se esta associação impede a metabolização. Portanto esses dados sugerem um maior aprofundamento na complexação e metabolização das β -glucanas associadas a agentes químicos.

O pós-tratamento demonstrou uma menor eficácia nos dois tipos celulares estudados quando comparados aos protocolos de tratamento simultâneo, independentemente do tipo do agente indutor de danos. Mas, devido à eficiência ainda encontrada na linhagem celular CHO-k1, acredita-se que a β -glucana possuiria uma capacidade de auxiliar na eficiência de reparo do DNA.

Diante desta análise nota-se que com os pré- e pós-tratamentos pode-se inferir uma maior interferência da capacidade metabólica da linhagem celular HTC na prevenção de danos ao DNA, talvez devido ao maior tempo de exposição da β -glucana a este sistema.

Existem basicamente duas classes de substâncias protetoras do DNA, as de mecanismo desmutagênico e as de bioantimutagênico (Kada et al., 1982). Substâncias desmutagênicas são aquelas capazes de impedir a ação dos agentes indutores de danos, principalmente por adsorção dos mesmos, portanto agem no meio extracelular, preferencialmente. Já os agentes bioantimutagênicos são aqueles capazes de atuar na prevenção da lesão ou no reparo do DNA, agindo no interior da célula. (Kada and Shimoi, 1987). De Flora (1998) ainda diz que as substâncias bioantimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA; ou estimulando o reparo livre de erro em danos no DNA; ou inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro.

Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação de moléculas ou compostos químicos em antimutagenicidade, faz-se necessário o uso de diferentes protocolos de tratamento (Flagg et al., 1995). Dos diferentes protocolos propostos pela literatura o

presente trabalho utilizou três: pré-tratamento, simultâneo com duas variações (simples e com pré-incubação) e pós-tratamento.

Considerando que o protocolo de tratamento simultâneo simples indique tanto a atividade desmutagênica como bioantimutagênica; o simultâneo pré-incubação uma atividade desmutagênica; e que o pré-tratamento e o pós-tratamento indiquem uma atividade, preferencialmente, bioantimutagênica; a análise do experimento com CHO-k1 permite inferir que o mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana é do tipo tanto desmutagênico como bioantimutagênico. Se verificada a porcentagem de redução de danos pode-se inferir ainda que a ação por bioantimutagênese é menor quando comparada com a desmutagênese.

Para os experimentos com HTC, nos quais as células foram tratadas com MMS, o mesmo raciocínio foi verificado, ou seja, pode-se inferir os mecanismos de desmutagênese e bioantimutagênese. No entanto, a capacidade metabólica da linhagem celular parece interferir neste processo visto que as duas menores doses perdem sua eficiência nos protocolos de pré- e pós-tratamento. O protocolo simultâneo com pré-incubação apresenta uma ineficiência de β_1 e β_3 , demonstrando a eficiência somente da dose intermediária. Nos experimentos com 2AA, este raciocínio não pode ser mantido visto que não foi verificada nenhuma eficiência no protocolo de pós-tratamento. Este fato sugere que o polissacarídeo de β -glucana não agiria pelo mecanismo de bioantimutagênese em células metabolizadoras. Este fato demonstra a necessidade de maiores e melhores esclarecimentos do papel protetor desses polissacarídeos. No entanto, pelos dados apresentados, assume-se que o polissacarídeo de β -glucana possua os dois tipos de mecanismo de ação, com uma melhor eficiência em desmutagênese quando analisada a porcentagem de redução de danos.

Corroborar a hipótese de desmutagênese o trabalho de Slameňová et al. (2003) que investigou o efeito protetor de três diferentes extratos de glucana, em três diferentes concentrações, em danos induzidos por peróxido de hidrogênio e azul de metileno na presença de luz visível. Este estudo demonstrou que o pré-tratamento com as glucanas foi eficiente em prevenir os efeitos genotóxicos através do ensaio do cometa em células V79.

Nos últimos anos aumentou a aceitação de que substâncias derivadas de produtos naturais possuam uma atividade antimutagênica e/ou anticarcinogênica. Ainda nota-se que estes agentes podem manifestar efeitos quimiopreventivos ou radiopreventivos e estes resultados podem ser mensurados, por exemplo, através de ação benéfica na recuperação da hematopoiese e também do sistema imune de pacientes expostos a estes tratamentos ou sujeitos à infecções oportunitas (Rankin et al., 1990).

Patchen et al. (1987) verificaram efeitos benéficos quando utilizaram β -glucana em animais submetidos à radiação. De acordo com seu estudo, a melhora não se deve somente à regeneração hematopoiética, mas os autores supõem que a glucana é capaz de inativar os radicais livres que poderiam causar danos ao organismo em teste, fato este também descrito no trabalho de Chorvatovicová (1991).

Diante deste relato pode-se inferir que a β -glucana teria atividade semelhante a agentes antioxidantes. Os agentes antioxidantes compõem o principal grupo de inibidores da carcinogênese visto que são bloqueadores de radicais livres. Além destes, são também inibidores da carcinogênese, os indutores de morte celular, inibidores enzimáticos e das enzimas do citocromo P450, inibidores da angiogênese, antagonistas de fatores de crescimento e agentes reparadores de lesões do DNA (Kleiner, 1997; Kelloff et al., 1999).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (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, flavonóides, licopenos, bilirrubinas (Sies, 1999) e onde, possivelmente, pode ser enquadrada a β -glucana.

Os alimentos contendo agentes antioxidantes constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (Ferrari and Torres, 2002).

As glucanas estão presentes, principalmente, na cevada, aveia e cogumelos, *mitake* e *shiitake* (Raymundo, 2004). Apesar destes alimentos não serem comuns na dieta da maioria das populações, a sua introdução é possível. Excluindo-se os cogumelos que são característicos da culinária japonesa e que possuem alto custo, a cevada, aveia e outros cereais possuem custos acessíveis e não necessariamente compõem pratos sofisticados. Desta forma, os cereais, considerados de baixo custo, de fácil preparo e altamente nutritivos podem compor pães, massas, biscoitos, tortas e farelos, que podem ser utilizados no enriquecimento de molhos, iogurtes e outros alimentos líquidos e pastosos, que após estudos mais criteriosos da sua relação com a possível prevenção de cânceres, poderão fazer parte de dietas balanceadas em um futuro próximo.

Ainda é prematura a finalização dos estudos com respeito ao mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana, bem como a sua indicação ou contra-indicação na quimioprevenção. Fazem-se necessários estudos bioquímicos que demonstrem melhor a estrutura do polissacarídeo em estudo e a sua interação com os agentes indutores de danos ao DNA, a fim de se esclarecer como realmente se efetiva a sua capacidade

desmutagênica. Necessita-se, também, de um melhor entendimento de como este polissacarídeo pode interagir com o DNA ou com as enzimas envolvidas na replicação e no reparo do mesmo, para que se possa discutir sua capacidade bioantimutagênica, além de saber se β -glucanas de diferentes origens possuem o mesmo mecanismo de ação e eficácia na prevenção de danos ao DNA.

Agradecimentos:

Esta pesquisa obteve apoio financeiro da CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

Agradecimentos a Dr. A. Levy e senhorita A.F. Silva pelo auxílio com a língua Inglesa e edição do manuscrito.

5. Referências:

Bellini MF, Angeli JPF, Matuo R, Terezan AP, Ribeiro LR, Mantovani MS.

Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology in Vitro*, *in press*, 2005.

Borges VC. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos.

In: Waitzberg DL ed. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu; 2001: 1495-509.

Brusick DJ ed. *Principles of genetic toxicology*, New York: Plenum Press; 1987: 284 p.

Chorvatovicová D. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co⁶⁰ in mice, *Strahlenther. Onkol.* 1991; 167: 612-4.

De Flora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.* 1998; 402: 151-8.

- Di Luzio NR, Williams DL, McNamee RB, Edwards BF, Kitahama A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucans, *Int. J. Cancer*. 1979; 24: 773-9.
- Falch BH, Espevik T, Ryan L, Stokke BT. The cytokine stimulating activity of (1→3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation, *Carbohydrate Res*. 2000; 329: 587-96.
- Fenech M, Crott J, Tuner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of method and results for hydrogen peroxide, *Mutagenesis*. 1999; 14: 605-12.
- Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet, *Mutation Res*. 1994; 307: 395-410.
- Ferrari CKB, Torres EA. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties, *Rev. Bras. Canc*. 2002; 48: 375-82.
- Flagg EW, Coates RJ, Greenberg RS. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans, *J. Am. Coll. Nutr*. 1995; 14: 419-27.
- Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin, *J. Nutr*. 1999; 129: 1438-41.
- Hofer M, Pospisil M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors results, *Int. J. Immunopharmac*. 1997; 19: 607-9.
- Holbrook TW, Cook JA, Parker BW. Immunization against *Leishmania doavani*: glucan as an adjuvant with killed promastigotes, *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1981; 30: 762-8.

- Kada T, Inoue T, Namiki N. Environmental desmutagens and antidesmutagens. In: Klekowski EJ ed. *Environ Mutag Plant Biol*. New York: Praeger; 1982: 137-51.
- Kada T, Shimoi K. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action, *Bio Essays*. 1987; 7: 113-5.
- Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Boone CW, Malone WA, Haw ET, Lieberman Lawrence JA, Kopelovich L, Ali T, Viner JL, Sigman CC. Progress in cancer chemoprevention, *N. Y. Acad. Sci.* 1999; 889: 1-13.
- Kleiner SM. Defense plants: foods that fight disease. 28 set. 1997. Available in: <http://www.physsportsmed.com>. Access in: 28 september 1998.
- Lin H, She Y, Cassileth B, Sirotnak F, Rundles SC. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro, *Int. Immunopharmac.* 2004; 4: 91-9.
- Maxwell SRJ. Prospects for the use antioxidant therapies, *Drugs*. 1995; 49: 345-61.
- Meira DA, Pereira PCM, Marcondes-Machado J, Mendes RP, Barraviera B, Pellegrino JRJ, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Castilho LM, Thomzaini I, Silva CL, Foss NT, Curri PR. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55: 496-503.
- Milner JA. Functional foods and health promotion, *J. Nutr.* 1999; 129: 1395-7.
- Patchen ML, D'Alesandro MM, Brook I, Blakely WF, Mac Vittie TJ. Glucan: mechanisms involved in its radioprotective effect, *J. Leukocyte Biol.* 1987; 42: 95-105.
- Rankin AJ, Sylvester I, Smith S, Yoshimura T, Leonard EJ, 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.* 1990; 86: 1556-64.

- Raymundo G.P. Betaglucana, você conhece?, 2004. Available in: <http://www.educacional.com.br/>. Access in: 25 jul. 2004.
- Reynolds JA, Kastello MD, Harrington DG, Crabs CL, Peters CJ, Jemski JV, Scott GH, Di Luzio NR. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases, *Infect Immun.* 1980; 30: 51-7.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense, *Eur. J. Biochem.* 1999; 215: 213-9.
- Slamenová D, Lábaj J, Krizková L, Kogan G, Sandula J, Bresgen N, Eckl P. Protective effects of fungal (1→3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Cancer Let.* 2003; 198: 153-60.
- Tohamy AA, El-Ghor AA, El-Nahas SM, Noshay MM. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin, *Mutation Res.* 2003; 541: 45-53.
- Tsiapali E, Whaley S, Kalbfleisch J, Ensley HE, Browder IW, Willians LD. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity, *Free Rad. Biol. Med.* 2001; 30: 393-402.
- Tzianabos AO, Cisneros RL. Prophylaxis with the immunomodulator PGG glucana enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria, *Ann. NY Acad. Sci.* 1996; 797: 285-7.
- Vukicevic V, Kampfinger K, Stopper H. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency, *Toxicology Letters.* 2004; 147, 187-95.

Tabela 01 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média e desvio padrão referentes ao ensaio do micronúcleo, na avaliação da mutagenicidade, em tratamentos de pulso de 3 horas:

Tratamento	Dose	Tipo Celular		HTC			
		CHO-k1		HTC			
		Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.	Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.
Controle		13	3 – 5	4,33 ± 1,16	32	7 – 14	10,67 ± 3,51
MMS	37,6µg/mL	121	36 – 44	40,33 ± 4,04**	170	54 – 61	56,67 ± 3,79**
2AA	5,0µg/ml	NA	NA	NA	77	21 – 29	25,67 ± 4,16**
β-Glucana	5,0µg/ml	16	3 – 7	5,33 ± 2,08 ^a	40	11 – 17	13,33 ± 3,21 ^a
	10,0µg/ml	13	4 – 5	4,33 ± 0,58 ^a	46	12 – 20	15,33 ± 4,16 ^a
	20,0µg/ml	28	7 – 11	9,33 ± 2,08 ^a	55	16 – 21	18,33 ± 2,52**

^aComparado estatisticamente com o Controle; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado; p<0,05); NA – Não aplicado.

Tabela 02 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo na avaliação da antimutagenicidade segundo o protocolo de pré-tratamento:

Tratamento	Dose	Tipo Celular		HTC					
		CHO-k1		HTC					
		Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células))	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)	Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)
Controle		11	3 – 4	3,67 ± 0,58		29	7 – 14	9,67 ± 3,77	
MMS	37,6µg/mL	117	37 – 42	39,00 ± 2,65**		105	30 – 43	35,00 ± 7,00**	
2AA	5,0µg/ml	NA	NA	NA		67	17 – 26	22,33 ± 4,73**	
β-Glucana +	5,0µg/ml	77	25 – 26	25,67 ± 0,58 ^b *	37,7	91	27 – 32	30,33 ± 2,89 ^b	18,4
	10,0µg/ml	68	17 – 28	22,67 ± 5,51 ^b *	46,2	83	26 – 30	27,67 ± 2,08 ^b	29,0
	MMS	20,0µg/ml	75	21 – 29	25,00 ± 4,00 ^b *	39,6	58	18 – 20	19,33 ± 1,16 ^b *
β-Glucana +	5,0µg/ml	NA	NA	NA	NA	52	12 – 20	17,33 ± 4,62 ^c	39,5
	10,0µg/ml	NA	NA	NA	NA	42	10 – 16	14,00 ± 3,46 ^c *	65,8
	2AA	20,0µg/ml	NA	NA	NA	30	9 – 12	10,00 ± 1,73 ^c *	97,4

^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com o MMS; ^cComparado estatisticamente com o 2AA; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado; p<0,05); NA – Não aplicado.

Tabela 03 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo na avaliação da antimutagenicidade segundo o protocolo simultâneo simples:

Tratamento	Dose	Tipo Celular							
		CHO-k1				HTC			
		Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células))	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)	Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)
Controle		13	3 – 5	4,33 ± 1,16		32	7 – 14	10,67 ± 3,51	
MMS	37,6µg/mL	121	36 – 44	40,33 ± 4,04**		170	54 – 61	56,67 ± 3,79**	
2AA	5,0µg/ml	NA	NA	NA		77	21 – 29	25,67 ± 4,16**	
β-Glucana + MMS	5,0µg/ml	53	17 – 20	17,67 ± 2,08 ^{b*}	63	48	13 – 19	16,00 ± 3,00 ^{b*}	88,4
	10,0µg/ml	47	13 – 18	15,67 ± 2,52 ^{b*}	68,5	76	19 – 30	25,33 ± 5,67 ^{b*}	68,1
	20,0µg/ml	42	9 - 17	14,00 ± 4,36 ^{b*}	73,1	66	18 – 26	22,00 ± 4,00 ^{b*}	75,4
β-Glucana + 2AA	5,0µg/ml	NA	NA	NA	NA	24	6 – 11	8,00 ± 2,65 ^{c*}	117,8
	10,0µg/ml	NA	NA	NA	NA	21	5 – 8	7,00 ± 1,73 ^{c*}	124,4
	20,0µg/ml	NA	NA	NA	NA	21	6 – 8	7,00 ± 1,00 ^{c*}	124,4

^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com o MMS; ^cComparado estatisticamente com o 2AA; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado; p<0,05); NA – Não aplicado.

Tabela 04 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo na avaliação da antimutagenicidade segundo o protocolo simultâneo com pré-incubação:

Tratamento	Dose	Tipo Celular				HTC			
		CHO-k1		Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)	Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)
		Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)						
Controle		17	5 – 7	5,67 ± 1,16		26	8 – 9	8,67 ± 0,58	
MMS	37,6µg/mL	107	32 – 41	35,67 ± 4,73**		125	34 – 57	41,67 ± 13,28**	
2AA	5.0µg/ml	NA	NA	NA		63	16 – 28	21,00 ± 6,25*	
β-Glucana + MMS	5.0µg/ml	39	10 – 16	13,00 ± 3,00 ^{b*}	75,5	107	26 – 36	32,33 ± 5,51 ^b	28,3
	10.0µg/ml	29	7 – 14	9,67 ± 3,79 ^{b*}	86,7	82	23 – 36	27,33 ± 7,51 ^{b*}	43,8
	20.0µg/ml	33	9 – 12	11,00 ± 1,73 ^{b*}	82,2	96	21 – 50	32,00 ± 15,72 ^b	29,3
β-Glucana + 2AA	5.0µg/ml	NA	NA	NA	NA	40	9 – 18	13,33 ± 4,51 ^{c*}	62,2
	10.0µg/ml	NA	NA	NA	NA	40	11 – 16	13,33 ± 2,52 ^{c*}	62,2
	20.0µg/ml	NA	NA	NA	NA	24	7 – 10	8,00 ± 1,73 ^{c*}	105,4

^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com o MMS; ^cComparado estatisticamente com o 2AA; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado; p<0,05); NA – Não aplicado.

Tabela 05 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo na avaliação da antimutagenicidade segundo o protocolo de pós-tratamento:

Tratamento	Dose	Tipo Celular							
		CHO-k1				HTC			
		Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)	Frequência MN (MN por 6000 células)	Número mínimo e máximo MN (MN por 6000 células)	Média ± D.P.	Porcentagem de Redução de Danos (%)
Controle		19	5 – 9	6,33 ± 2,31		24	4 – 11	8,00 ± 3,61	
MMS	37,6µg/mL	116	35 – 42	39,67 ± 3,51**		122	35 – 45	40,67 ± 5,13**	
2AA	5.0µg/ml	NA	NA	NA		55	18 – 19	18,33 ± 0,58**	
β-Glucana + MMS	5.0µg/ml	101	31 – 36	33,67 ± 2,52 ^b	15,5	111	33 – 45	37,00 ± 6,93 ^b	11,2
	10.0µg/ml	68	18 – 26	22,67 ± 4,16 ^{b*}	49,5	110	34 – 41	36,67 ± 3,79 ^b	12,3
	20.0µg/ml	77	23 – 29	25,67 ± 3,06 ^{b*}	40,2	73	21 – 29	24,33 ± 4,16 ^{b*}	50,0
β-Glucana + 2AA	5.0µg/ml	NA	NA	NA	NA	43	12 – 17	14,33 ± 2,52 ^c	38,7
	10.0µg/ml	NA	NA	NA	NA	44	13 – 16	14,67 ± 1,53 ^c	35,5
	20.0µg/ml	NA	NA	NA	NA	40	12 – 15	13,33 ± 1,53 ^c	48,4

^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com o MMS; ^cComparado estatisticamente com o 2AA; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado; p<0,05); NA – Não aplicado.

Tabela 06 – Porcentagem de incremento ou decréscimo da atividade antimutagênica da β-glucana dos diferentes protocolos experimentais comparados ao protocolo simultâneo:

Tratamento	Dose de β-glucana	Tipos Celulares					
		CHO-k1			HTC		
		Protocolos de Tratamento					
		Pré	Pré-incubação	Pós	Pré	Pré-incubação	Pós
β-Glucana + MMS	5.0µg/ml	-40.2	+19.8	-75.4	-79.2	-68.0	-87.3
	10.0µg/ml	-32.5	+26.6	-27.7	-57.4	-35.7	-81.9
	20.0µg/ml	-45.8	+12.5	-45.0	-18.0	-61.1	-33.7
β-Glucana + 2AA	5.0µg/ml	NA	NA	NA	-66.5	-47.2	-67.1
	10.0µg/ml	NA	NA	NA	-47.1	-50.0	-71.5
	20.0µg/ml	NA	NA	NA	-54.6	-50.8	-77.4

NA – Não aplicado

4. ARTIGO 2

**Avaliação do efeito protetor da β -Glucana, extraída da
Saccharomyces cerevisiae, no dano do DNA e viabilidade celular
(necrose e apoptose) em células CHO do tipo selvagem (k1) e
deficiente em reparo (xrs5)**

Artigo a ser submetido à Revista *Toxicology in vitro*

Avaliação do efeito protetor da β -glucana, extraída da *Saccharomyces cerevisiae*, no dano do DNA e viabilidade celular (necrose e apoptose) em células CHO do tipo selvagem (k1) e deficiente em reparo (xrs5)

Rodrigo Juliano Oliveira¹, Lúcia Regina Ribeiro², Renata Matuo¹, Ariane Fernanda da Silva¹, Hevenilton José Matiazi³, Mário Sérgio Mantovani^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil

²Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro (SP), Brasil

³Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil

*Autor correspondente:

Telefone: +55 43-3371 4417; Fax: +55 43-3371 4527

e-mail: biomsm@uel.br

Resumo

Um grande número de alimentos funcionais, que possuem a β -glucana em sua composição, demonstra correlação com a prevenção do desenvolvimento de câncer e de outras patologias crônicas. A descrição de seu mecanismo de ação, bem como a compreensão de seus efeitos como um agente antigenotóxico, anticlastogênico e sua capacidade de preservação da viabilidade celular são objetivos desse estudo, no qual utilizou-se das células CHO das linhagens k1 e xrs5. O teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese indicou que as diferentes doses de β -glucana testadas (5,0, 10,0, 20,0 e 40,0 $\mu\text{g/ml}$) não apresentaram efeitos clastogênicos. Na linhagem celular CHO-k1 pode-se observar efeito quimiopreventivo em todos os protocolos testados: pré-tratamento, simultâneo simples e com pré-incubação e pós-tratamento, indicando os mecanismos de ação por desmutagênese e bioantimutagênese. Porém, sendo este último com menor eficácia. Já para a linhagem celular deficiente em reparo CHO-xrs5, a β -glucana não apresentou atividade protetora no pós-tratamento sugerindo assim a hipótese de bioantimutagênese. No ensaio do cometa em células CHO-k1, a β -glucana não apresentou efeito tanto genotóxico como antigenotóxico. Os testes de viabilidade celular indicam que a β -glucana melhora o índice de viabilidade celular, em ambas as linhagens, prevenindo eventos de apoptose. Estes dados estimulam o uso da β -glucana, bem como, sugerem que quando este polissacarídeo está presente em alimentos daria a estas características nutracêuticas podendo participar da suplementação de dietas ou talvez compor um novo fármaco de origem natural.

Palavras-chave: β -glucana, células CHO-k1, células CHO-xrs5, mecanismo de ação, antimutagênese

1. Introdução

Estudos apontam que o aumento da ingestão de alimentos naturais está diretamente relacionado à diminuição do risco do desenvolvimento de cânceres e de outras patologias (Weisburger, 2000; Ferrari and Torres, 2002). Diante deste fato, as pesquisas em genética toxicológica visam avaliar os efeitos genotóxicos e clastogênicos de xenobióticos, bem como encontrar novas substâncias com efeitos quimioprotetores e que possam amenizar os efeitos adversos daqueles.

Dentre os componentes destas dietas estão alguns produtos que compõem a classe das fibras alimentares como os cereais, principalmente aveia e cevada, os cogumelos, as algas e as leveduras. Em geral, as fibras podem ser fontes de β -glucana. A β -glucana é um dos componentes presentes em maior quantidade nas paredes celulares de diversos organismos. No caso dos fungos 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 e sua função é manter a rigidez e forma celular (Sandula et al., 1995).

Dentre outras funções da β -glucana está sua capacidade antígenotóxica frente a agentes indutores de danos no DNA, tais como peróxido de hidrogênio (Slamenová et al., 2003), ciclofosfamida (Tohamy et al., 2003) e doxorrubicina (Lin et al., 2004).

Mesmo diante da constatação da eficácia da β -glucana frente a estes danos, o mecanismo de ação deste polissacarídeo ainda não está totalmente esclarecido, sendo necessários novos estudos. O presente trabalho descreveu o mecanismo de ação do

polissacarídeo β -glucana, extraído de *Saccharomyces cerevisiae*, em teste de antigenotoxicidade, antimutagenicidade e viabilidade celular em células de ovário de *hamster* chinês (CHO) do tipo selvagem (k1) e deficiente em reparo (xrs5) por meio do ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, ensaio do cometa e viabilidade celular, pela coloração diferencial com Laranja de Acridina e Brometo de Etídeo, em diferentes protocolos experimentais: tratamentos simultâneos simples, tratamentos simultâneos após pré-incubação, pré-tratamentos e pós-tratamentos.

2. Material e Métodos

2.1. Agente indutor de danos no DNA

Para a indução de danos no DNA, utilizou-se o agente alquilante, de ação direta, Metilmetanosulfonato – MMS (Merck) diluído em solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{2+} e Mg^{+2} , pH 7,4, estéril. A concentração final no ensaio do micronúcleo foi de 37,6 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem CHO-k1. Já para a linhagem CHO-xrs5 foi utilizada uma concentração final de 18,8 $\mu\text{g/mL}$. Para o teste do cometa, a concentração final de MMS foi de 4,23 $\mu\text{g/mL}$ em ambas as linhagens.

2.2. Extração das β -glucanas

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.

A solução do agente antimutagênico, β -Glucana, foi preparada em PBS e utilizada nas concentrações finais, em cultura de 5,0, 10,0, 20,0 e 40,0 μ g/mL; neste trabalho denominadas β_1 , β_2 , β_3 e β_4 , respectivamente.

2.3. Linhagem Celular

As linhagens celulares de ovário de hamster Chinês (CHO) do tipo selvagem (k1) e deficientes no mecanismo de reparo de fita dupla de DNA (xrs5), utilizadas nesse estudo foram fornecidas pelo Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto, Universidade Estadual de São Paulo – USP, pela Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi. Para os testes de micronúcleo 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, em frasco de 25cm². Para o teste do cometa as células foram cultivadas em tubos para cultura de células e tecidos superfície plana (110mm x 16mm) com 2,5mL de meio de cultura segundo as especificações descritas anteriormente. Nestas condições, o tempo de ciclo celular é de aproximadamente 12 horas para as duas linhagens celulares. Para ambos os experimentos os frascos foram montados com 1,0 x 10⁶ células.

2.4. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Na avaliação da mutagenicidade, com a linhagem celular CHO-k1, as células foram cultivadas por dois ciclos completos (24 horas) e tratadas por 3 horas em meio de cultivo livre de soro bovino fetal. Os tratamentos realizados foram: a. controle; b. MMS; e c. β -Glucana em quatro diferentes concentrações (β_1 , β_2 , β_3 , e β_4). Ao término deste período, as culturas foram lavadas com PBS (2 vezes), acrescentou-se meio de cultura suplementado e citocalasina-B (Cyt-B – Sigma) na concentração de 3 μ g/mL permanecendo por 17 horas.

Para a antimutagenicidade na qual a β -glucana (β_1 , β_2 , β_3 , e β_4) foi associada ao MMS realizou-se os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo simples, tratamento simultâneo após pré-incubação e pós-tratamento da seguinte maneira:

(I) Pré-tratamento – as células CHO-k1 foram cultivadas por 7 horas, em seguida acrescentou-se as β -glucanas ao meio de cultivo por outras 17 horas. Acrescentou-se meio

de cultivo não suplementado e procedeu-se o tratamento por 3 horas com MMS (tratamento de pulso – 3 horas). Acrescentou-se meio de cultura suplementado e citocalasina-B, permanecendo em cultivo por 17 horas. Antes e depois de cada procedimento as células foram lavadas com PBS;

(II) Simultâneo simples – as células foram cultivadas por dois ciclos completos (24 horas). A seguir foi adicionado MMS associado com as β -glucanas, em tratamento por 3 horas, em meio não suplementado. Acrescentou-se meio de cultura suplementado e citocalasina-B para cultivo por 17 horas. Antes e depois de cada procedimento as células foram lavadas com PBS;

(III) Simultâneo após pré-incubação – para esta fase do experimento procedeu-se o mesmo protocolo do tratamento simultâneo como descrito no item anterior. No entanto, antes do tratamento das culturas as soluções de tratamento (MMS+ β -glucanas) foram pré-incubados por 1 hora em estufa a 37°C. Antes e depois de cada procedimento as células foram lavadas com PBS;

(IV) Pós-tratamento – as células foram cultivadas por dois ciclos completos (24 horas). Então as células foram tratadas por 3 horas com MMS. Após este período o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com β -glucanas em meio suplementado acrescido de citocalasina-B, por um período de 17 horas. Antes e depois de cada procedimento as células foram lavadas com PBS.

Para os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade com a linhagem celular CHO-xrs5 realizou-se os seguintes tratamentos: a. controle; b. MMS; c. β_4 ; e d. MMS + β_4 . Os protocolos utilizados foram o simultâneo e o pós-tratamento.

A colheita das células foi realizada com tripsina-EDTA (0,025%) com posterior hipotonização rápida com citrato de sódio (1%) e uma gota de formaldeído a 40%. A fixação foi realizada com metanol-ácido acético (3:1) e as lâminas foram coradas com Giemsa 5%.

Foram realizadas três repetições independentes para cada tratamento, em cada teste. Os critérios para seleção de células binucleadas foram: (I) delimitações nucleares intactas; (II) núcleos com tamanhos semelhantes, coloração padrão e de mesma intensidade; (III) núcleos principais podendo estar próximos, mas não sobrepostos e com limites nucleares distinguíveis; (IV) o limite citoplasmático da célula binucleada intacta, e com limite citoplasmático distinguível das células adjacentes. O micronúcleo, por sua vez, presente nas células binucleadas, não deveria ter tamanho superior a 1/3 dos núcleos principais além de possuir coloração padrão e não ser refringente.

Analisou-se 6000 células binucleadas por tratamento, sendo 2000/tratamento/repetição. A análise estatística foi realizada usando o teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

2.5. Teste do cometa

Para a realização do teste do cometa as células CHO-k1 foram cultivadas por dois ciclos completos (24h) antes dos tratamentos. Os tratamentos foram realizados em meio não suplementado.

Na avaliação da genotoxicidade fez-se os seguintes tratamentos: a. controle; b. MMS; e c. β -Glucanas (β_1 ; β_2 ; β_3 ; e β_4). Os tratamentos foram realizados por 3 horas. Após

este período as culturas foram colhidas. Para a avaliação da antigenotoxicidade fez-se as associações do MMS com as quatro diferentes concentrações de β -glucana. Os protocolos utilizados foram: (I) Simultâneo simples – onde o MMS e a β -glucana foram adicionados ao mesmo tempo às culturas e (II) Simultâneo com pré-incubação – onde o MMS e a β -glucana, nas diferentes concentrações, foram incubados a 37°C, por 1 hora antes de serem adicionados às culturas. A colheita foi realizada após os tratamentos.

Para o procedimento de colheita, o meio de cultura com tratamento foi descartado, as células foram tripsinizadas (tripsina-EDTA, 0,025%), centrifugadas e obtida a suspensão celular em 0,5mL de meio de cultura. Para a montagem das lâminas depositou-se 20,0 μ L de suspensão celular com 120,0 μ L de agarose LPM (1,5%), a 37°C, em lâmina pré-coberta com agarose normal (5%) e estas foram recobertas por lamínula de vidro e resfriadas a 4°C por 20 minutos. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise, recentemente preparada, composta por 89,0mL de estoque de lise (2,5M NaCl, 100,0mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido, 890,0 mL de água destilada e 1% de laurilsarcosinato de sódio), 1,0 mL de Triton X -100 (Merck) e 10,0 mL de DMSO. A lise se deu por 1 hora, à temperatura de 4°C, protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram encaminhadas para a cuba de eletroforese com tampão pH>13,0 (300,0mM NaOH e 1,0mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de NaOH 10,0N e EDTA 200,0mM pH10,0) a 4°C por 20 minutos para a denaturação do DNA. A eletroforese foi realizada à 25,0V e 300,0mA (1,25V/cm). Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl) durante 3 ciclos de 5 minutos, secas ao ar livre, fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos e guardadas para leitura a posteriori. Para coloração, as lâminas foram cobertas com 100,0 μ L de Brometo de Etídeo

(20,0 μ g/mL) e lamínula. O material foi avaliado em microscópio de fluorescência (Nikon) no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

Foram analisadas visualmente 100 células por tratamento, classificando-se os cometas em: (classe 0) células não danificadas que não apresentam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; (classe 2) células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; (classe 3) células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Células apoptóticas, que apresentam nucleóide totalmente fragmentado, não foram contabilizadas. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão a qual pertenciam pelo valor da classe. A análise estatística foi realizada usando o teste t-Student ($p < 0,05$).

2.6. Cálculo da Porcentagem de Redução de Danos

A porcentagem de redução dos danos do agente mutagênico e/ou genotóxico pela β -glucana foi calculada através da média do número de células com danos observadas no tratamento com o agente indutor de danos (MMS) menos o número de células com danos observadas no tratamento de antimutagenicidade e/ou antigenotoxicidade x 100, dividido pelo número de células com danos observadas no tratamento com o agente indutor de dano, menos o número de células com danos do controle.

2.7. Teste de Viabilidade Celular

A técnica para detecção da viabilidade celular, índice de apoptose e de necrose foi a de coloração diferencial, com Laranja de Acridina e Brometo de Etídeo, em microscopia de fluorescência.

As lâminas foram preparadas utilizando-se uma alíquota de 50,0 μ L de suspensão celular, obtida no teste do micronúcleo para a linhagem celular CHO-xrs5 e no teste do cometa para a linhagem celular CHO-k1, anteriormente descritos, e 2,0 μ L de corante (100,0 μ g/mL de Laranja de Acridina e 100,0 μ g/mL de Brometo de Etídeo, ambos diluídos em PBS). Foram analisadas 200 células por repetição em microscópio Nikon, em objetiva de 60 vezes, com filtros para fluorescência (515-560nm).

A classificação das células foi realizada segundo a descrição: (I) células vivas com membrana funcional possuem coloração verde uniforme em seu núcleo; (II) células em apoptose inicial com membrana funcional, mas com fragmentação de DNA, demonstram uma coloração verde no núcleo e citoplasma, sendo visível uma marginalização do seu conteúdo nuclear; (III) células em apoptose final apresentam áreas coradas em alaranjado, tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distingue de células necróticas; (IV) células necróticas têm coloração alaranjada uniforme no núcleo.

O índice de viabilidade celular foi calculado pela relação do número de células normais x 100 e o número de células analisadas. Para o índice de apoptose, calculou-se a relação entre a soma de células em apoptose inicial e final x 100 e o número de células analisadas. Já para o índice de necrose, fez-se a relação entre o número de células

necróticas x 100 e o número de células analisadas. A análise estatística foi realizada através do teste t-Student ($p < 0,05$).

3. Resultados

A frequência, número mínimo e máximo, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo na linhagem celular CHO-k1 estão apresentados na Tabela 01.

A análise estatística dos testes de mutagenicidade demonstrou que as quatro diferentes doses de β -glucana não apresentaram efeito clastogênico e a frequência de micronúcleos foi próxima daquela verificada no controle.

As associações em pré-tratamento demonstraram eficiência quimiopreventiva para todas as doses de β -glucanas testadas e a porcentagem de redução de danos variou de 35,0 a 57,3.

No tratamento simultâneo simples verificou-se que β_1 e β_2 não foram efetivas na prevenção dos danos clastogênicos causados pelo MMS. Desta forma, somente β_3 e β_4 apresentaram atividade anticlastogênica, com porcentagens de redução de danos de 53,0 e 55,6%, respectivamente. No entanto, o tratamento simultâneo após pré-incubação aumentou a eficiência das β -glucanas. Neste protocolo, assim como em pré-tratamento, as quatro doses testadas foram eficientes na prevenção aos danos no DNA. As porcentagens de redução de danos verificadas foram de 51,3, 42,7, 56,4 e 47,9% para β_1 , β_2 , β_3 e β_4 , respectivamente.

O protocolo de pós-tratamento demonstrou que β_2 , β_3 e β_4 foram eficientes na redução da frequência de micronúcleos e as porcentagens de redução de danos foram, respectivamente, 37,6, 31,6 e 34,2%.

Em nenhum dos protocolos anteriormente mencionados foi verificada uma correlação dose-resposta.

Uma visão geral dos dados referentes ao ensaio do micronúcleo em CHO-k1 demonstra que a eficiência das diferentes doses nos diferentes protocolos de tratamento sofreu variações consideráveis. No entanto, o protocolo de tratamento simultâneo após pré-incubação foi o que demonstrou melhores resultados quimiopreventivos. E o protocolo que apresentou menor eficiência, com relação à porcentagem de redução de danos, foi o de pós-tratamento. Estas considerações podem ser observadas na Tabela 02, a qual apresenta a porcentagem de incremento ou decréscimo da porcentagem de redução de danos ao DNA. O cálculo deste parâmetro foi realizado dividindo-se a porcentagem de redução de danos das diferentes β -glucanas no protocolo simultâneo com pré-incubação, que demonstrou a melhor eficiência, pelos correspondentes tratamentos nos demais protocolos $\times 100$, subtraindo-se o valor encontrado de 100. Assim, pode-se demonstrar que o protocolo de tratamento simultâneo com pré-incubação foi o mais eficiente para todas as doses testadas e em todos os protocolos, excetuando-se para β_2 no pré-tratamento e para a β_4 no tratamento simultâneo simples.

A Tabela 03 apresenta a frequência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade, nos protocolos simultâneo simples e simultâneo após pré-incubação, no ensaio do cometa na

linhagem celular CHO-k1. A análise estatística demonstrou que nenhuma das quatro diferentes concentrações de β -glucana testadas apresentou efeitos genotóxicos.

A avaliação das associações entre o MMS e as glucanas demonstrou que em nenhum dos protocolos, tratamento simultâneo ou simultâneo após pré-incubação, houve efeito quimiopreventivo.

A Tabela 04 demonstra a frequência de células normais, em apoptose inicial, final e necrose na linhagem celular CHO-k1. Encontram-se também transcritos os índices de viabilidade celular, apoptose e necrose.

A análise estatística demonstrou que os tratamentos de pulso (3 horas) com as quatro doses de β -glucana não provocaram alterações nos índices de viabilidade celular, apoptose e necrose. Os índices de viabilidade celular para as β -glucanas foram semelhantes ao controle e variaram de 66,8 a 71,3 para β_3 e β_1 , respectivamente.

O protocolo de tratamento simultâneo simples demonstrou que a β -glucana, nas quatro diferentes concentrações, possui capacidade de alterar o índice de viabilidade celular, aumentando-o de forma estatisticamente significativa. O aumento da viabilidade celular está diretamente correlacionado à capacidade da β -glucana em diminuir o índice de apoptose, o qual, também, se mostrou estatisticamente significativo quando comparado ao agente indutor de danos. Os índices de viabilidade celular foram próximos aos daqueles encontrados nos tratamentos de pulso para as β -glucanas e no controle. A variação observada foi de 61,6 para a associação do MMS com β_2 a 66,5 para a associação com β_3 . A análise do índice de necrose demonstra que nos tratamentos simultâneos simples houve um aumento geral. No entanto, somente a β_1 demonstrou um aumento estatisticamente significativo.

O protocolo de tratamento simultâneo após pré-incubação apresenta resultados de maior eficiência do que os do simultâneo em relação ao índice de viabilidade celular. E as variações observadas foram entre 63,0 e 80,6 para β_1 e β_2 , respectivamente. Novamente o aumento do índice de viabilidade celular demonstra-se diretamente relacionado à capacidade da β -glucana em diminuir o índice de apoptose, o qual, por sua vez, também apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao agente indutor de danos. Apesar das quatro concentrações de β -glucana elevarem o índice de necrose, este aumento não foi estatisticamente significativo para nenhuma das doses.

A frequência, número mínimo e máximo, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes aos ensaios do micronúcleo nos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade em células do tipo CHO-xrs5 estão apresentados na Tabela 05.

A avaliação da mutagenicidade com a β -glucana de maior dose utilizada neste estudo, β_4 , não apresentou atividade clastogênica. E a sua associação ao MMS demonstrou efeito quimiopreventivo no protocolo de tratamento simultâneo simples. Já no protocolo de pós-tratamento não foi verificada nenhuma capacidade de proteção ao DNA. A porcentagem de redução de danos foi de 39,7 e 2,96% para os protocolos de tratamento simultâneo simples e pós-tratamento, respectivamente.

A Tabela 06 apresenta os dados referentes aos índices de viabilidade celular, apoptose e necrose referentes ao ensaio com CHO-xrs5. Também estão presentes a frequência de células normais, em apoptose inicial e final e necrose.

A análise permitiu verificar que a β_4 provocou uma diminuição no índice de viabilidade celular e um aumento no índice de apoptose de forma estatisticamente significativa. Já o índice de necrose foi igual a zero.

As associações da β -glucana com o MMS, nos protocolos de tratamento simultâneo e pós-tratamento demonstraram um aumento significativo no índice de viabilidade celular relacionado a um decréscimo do índice de apoptose. No entanto, a maior eficiência foi observada no protocolo de tratamento simultâneo simples. Em ambos os protocolos de tratamento não foram encontradas células em necrose.

A Tabela 07 apresenta um sumário dos resultados referentes aos ensaios do micronúcleo nas duas linhagens celulares. A análise destes dados permite inferir que o polissacarídeo de β -glucana possui atividade tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese, visto que a linhagem celular CHO-k1 indicou atividade protetora em todos os protocolos testados. A porcentagem de redução de danos foi menor no protocolo de pós-tratamento. Diante deste fato fez-se a avaliação da linhagem celular deficiente em reparo (CHO-xrs5), para que se pudesse confirmar ou não a hipótese de bioantimutagênese.

4. Discussão

Estudos já realizados na área de câncer e genética toxicológica apontam alguns marcadores biológicos importantes. Preparações de glucanas, extraídas de *Saccharomyces cerevisiae*, foram capazes de causar redução significativa no crescimento de carcinomas mamários e em melanomas B16. Estes mesmos extratos foram também eficientes em aumentar a sobrevivência de camundongos A/J e C57BL/6J com implante tumoral subcutâneo (Di Luzio et al., 1979).

Estudos *in vivo* relatam a eficiência da β -glucana, de baixo peso molecular, em prevenir efeitos mutagênicos quando os animais foram expostos à ciclofosfamida. Estes

estudos mediram a capacidade anticlastogênica da β -glucana através do ensaio do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos (Chorvatovicová et al., 1996; Chorvatovicová et al., 1998).

Um estudo de genotoxicidade *in vitro* relata a eficácia de β -glucanas em prevenir danos genotóxicos causados em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79) pelo peróxido de hidrogênio (Slamenová et al., 2003).

No presente trabalho foi utilizado o metilmetanosulfonato (MMS) como o agente indutor de danos no DNA. Esta substância é classificada como um agente alquilante e os danos causados por ele envolvem a transferência de grupos metil para as bases nitrogenadas do DNA, levando a pareamentos de bases alterados que podem introduzir transições, transversões e mudanças de matriz de leitura, além da capacidade de induzir quebras cromossômicas, uma vez que alguns agentes alquilantes, particularmente os disfuncionais, possuem a capacidade de se intercalar nos filamentos e/ou nas moléculas de DNA (Snustad and Simmons, 2001).

Na presente pesquisa quatro diferentes doses de β -glucana foram testadas quanto à sua capacidade antigenotóxica, anticlastogênica e no aumento da viabilidade celular em sistemas de culturas de células CHO-k1 e CHO-xrs5. No entanto, antes de avaliar estes efeitos, foi realizada uma avaliação das suas capacidades genotóxica, clastogênica e indutora de apoptose e necrose nestas mesmas culturas.

As quatro diferentes doses de β -glucana testadas em CHO-k1 não apresentaram capacidade de induzir danos do tipo clastogênico e/ou genotóxico medidos pelos ensaios de micronúcleo e cometa, respectivamente. As mesmas doses também não provocaram diminuição do índice de viabilidade celular e/ou aumento dos índices de apoptose e

necrose. Na linhagem CHO-xrs5 foi testada somente a maior dose de β -glucana, e também neste sistema não houve alteração nos mesmos parâmetros analisados.

Na avaliação da anticlastogenicidade em células CHO-k1, o protocolo de pré-tratamento demonstrou que todas as doses testadas apresentaram eficiência quimiopreventiva. O protocolo de tratamento simultâneo simples indicou efeito preventivo somente nas duas doses mais altas e a porcentagem de redução destas mostrou um discreto aumento em relação às mesmas doses no protocolo de pré-tratamento. Este fato pode sugerir que a interação entre os agentes clastogênico e anticlastogênico possa se iniciar ainda no meio extracelular e prosseguir após se encontrarem no meio intracelular, e desta forma seria verificada uma menor biodisponibilidade de MMS que poderiam causar danos às moléculas de DNA, tanto no caso do pré-tratamento como com as maiores doses de β -glucana no tratamento simultâneo simples.

O protocolo de tratamento simultâneo após pré-incubação indica que todas as doses apresentaram-se eficientes na prevenção dos danos clastogênicos. Apesar das duas doses não efetivas em tratamento simultâneo simples (β_1 e β_2) apresentarem agora uma efetividade estatisticamente significativa, as porcentagens de redução não diferem de forma discrepante, ou seja, os valores encontram-se ainda relativamente próximos. Este fato pode sugerir que as moléculas de MMS foram inativadas de forma mais eficiente no tratamento da pré-incubação, como se a β -glucana, uma vez no interior da célula, se ligasse ao MMS para realizar uma inativação química ou induzisse a célula a estar melhor preparada para evitar os danos no DNA durante a replicação.

O pós-tratamento demonstrou que somente a menor dose não foi eficiente na prevenção aos danos. Ainda que a porcentagem de redução de danos tenha sido menor

neste protocolo quando comparada a todos os outros, este fato pode sugerir que a β -glucana possa atuar na célula após a indução do dano pelo MMS, talvez com alguma função estimuladora no sistema de reparo do DNA.

Segundo Kada et al. (1982,) existem dois tipos de substâncias protetoras do DNA, as que agem por desmutagênese, e aquelas que agem por bioantimutagênese. As substâncias desmutagênicas são capazes de impedir a ação dos agentes indutores de danos, principalmente por adsorção aos mesmos. Já as bioantimutagênicas, em geral, atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA (Kada and Shimoi, 1987; De Flora, 1998). Logo, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana, utilizou-se de protocolos descritos pela literatura pertinente: pré-tratamento, tratamento simultâneo simples e após pré-incubação e pós-tratamento (De Flora, 1998).

Diante dos dados obtidos nesta pesquisa, pode-se supor que o mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana seja tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese sendo este último de menor eficiência devido apresentar uma menor porcentagem de redução de danos em pós-tratamento. Este fato deixa dúvidas em relação à possibilidade de se afirmar ou não a eficiência do polissacarídeo por bioantimutagênese. Para auxiliar no esclarecimento desta questão, na presente pesquisa decidiu-se utilizar a linhagem celular CHO-xrs5, deficiente em reparo, para verificar se a β -glucana estaria realmente agindo por este meio.

Os resultados dos protocolos de tratamento simultâneo simples e pós-tratamento com esta segunda linhagem celular demonstraram que, mesmo sendo deficiente em reparo, as células submetidas ao primeiro protocolo mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao agente indutor de danos, o quê sugere o mecanismo de

ação por desmutagênese. No entanto, os resultados obtidos no pós-tratamento não apresentaram nenhuma eficiência antimutagênica da β -glucana visto que este protocolo avalia a indução de mecanismo de reparo, e esta linhagem celular é deficiente no mesmo.

O tratamento simultâneo simples na linhagem celular CHO-k1, com a dose mais alta de β -glucana, apresentou uma porcentagem de redução de danos igual a 55,6%. Já na linhagem celular CHO-xrs5, esta porcentagem foi menor (39,7%). Percebe-se então uma diferença de aproximadamente 15,9% na eficiência quimiopreventiva das linhagens celulares. Este fato sugere que a deficiência no reparo possa ser a responsável por este decréscimo, visto que um dano clastogênico, causado em exposição simultânea a um agente clastogênico e outro anticlastogênico, possa ser reparado a posteriori. Esta relação tão direta talvez não seja totalmente adequada, visto que as doses de MMS usadas para esta comparação não foram as mesmas. A dose de exposição da segunda linhagem celular é de 50% da utilizada para a CHO-k1, o que pode sugerir uma menor indução de danos. Porém, pôde-se notar em experimentos pilotos, dados não apresentados, que a exposição à mesma concentração de MMS causava um alto índice de morte celular e atraso no índice mitótico, impossibilitando-se, assim, a contagem das 2000 células binucleadas/tratamento. Nota-se, então, que a linhagem celular CHO-xrs5 é mais susceptível a danos causados pelo agente alquilante, e talvez este fato promova uma compensação indireta da menor dose utilizada. Auxiliam no entendimento deste fato trabalhos citogenéticos que demonstram que linhagens celulares deficientes em reparo apresentam maior quantidade de danos clastogênicos espontâneos e que danos induzidos por agentes, como o MMS, são bem maiores quando comparados às linhagens selvagens (Stopper et al., 1997).

O protocolo de pós-tratamento em CHO-k1 demonstrou uma porcentagem de redução de danos de 34,2%, com a β_4 e nesta mesma dose para CHO-xrs5 observou-se uma porcentagem de redução de danos de 2,96%. Este fato demonstra uma diferença de cerca de 31,2% na eficiência. Assim, fica claro que a porcentagem de redução de danos na segunda linhagem, além de não ser estatisticamente significativa, é muito baixa, o que pode sugerir que não houve nenhuma ação por bioantimutagênese. Desta forma, esta ausência de ação corrobora a hipótese de mecanismo de ação por bioantimutagênese proposta para a linhagem celular CHO-k1.

Estudos indicam que a carcinogenicidade e a mutagenicidade são dois processos que estão relacionados uma vez que muitos carcinógenos químicos podem interagir com o material genético. Assim, partindo-se do princípio que um câncer possa ser induzido por um evento mutacional (Ames et al., 1973; Vogel, 1982), pode-se pensar na utilização das β -glucanas como agentes anticancerígenos e/ou antimutagênicos.

Estudos descrevem a atividade anticancerígena da β -glucana, e alguns desses polissacarídeos extraídos de fungos, têm sido utilizados clinicamente no Japão (Kaneno et al., 1989). Segundo Charvatovicová et al. (1998) seria importante estudar nestas terapias a administração concomitante da β -glucana e da ciclofosfamida, quimioterápico, para que se demonstrasse a possibilidade daquela em diminuir os efeitos adversos da quimioterapia. No entanto, ainda são muito controversos os princípios moleculares e bioquímicos que envolvem a atividade antitumoral, antimutagênica e imunoestimulatória das diferentes β -glucanas (Kishida et al., 1992; Saitô et al., 1991; Demleitner et al., 1992). Neste contexto, esta pesquisa contribui para o entendimento do mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana em suas atividades anticlastogênicas. Logo, a elucidação da ação deste

polissacarídeo por desmutagênese e bioantimutagênese pode auxiliar na condução de novas terapias em carcinogênese.

O ensaio do cometa demonstrou que as quatro diferentes concentrações de β -glucana não apresentam atividade genotóxica. No entanto, quando estas mesmas doses de β -glucana foram associadas ao agente indutor de danos, MMS, nenhum efeito antigenotóxico foi evidenciado. A literatura indica que, em protocolos de tratamento simultâneo com pré-incubação de β -glucanas com peróxido de hidrogênio e azul de metileno, em células V79 (fibroblasto de pulmão de hamster Chinês), foram verificados efeitos antigenotóxicos (Slamenová et al., 2003). Mas os dados da presente pesquisa não demonstraram eficiência. Faz-se necessário dizer que apesar dos dois estudos utilizarem β -glucanas de mesma origem, *Saccharomyces cerevisiae*, a forma de extração foi diferente, fato que dificulta a discussão dos dados. Outro fato ainda a ser considerado é a diferença das linhagens celulares testadas, visto que estas podem possuir respostas diferentes aos agentes em teste. Uma outra questão a ser considerada é a eficiência de danos causados por formas reativas de oxigênio e aqueles causados por um agente alquilante, já que este último apresenta uma maior eficiência. Assim, este fato demonstra que a eficiência da β -glucana poderia ser mais facilmente detectada em um protocolo que utilizasse como agente indutor de danos um agente que apresente características menos genotóxicas.

O fato anteriormente descrito pode criar questionamentos a respeito da real atividade e eficiência da β -glucana em quimioprevenção. Assim, faz-se necessário pensar que os dois testes apresentados até o momento avaliam danos diferentes. O teste do micronúcleo quantifica danos citogenéticos, ou seja, eventos mutacionais já fixados no

genoma celular (Salvadori et al., 2003); já o teste do cometa indica danos genotóxicos, que podem ou não se tornar mutações.

O teste de viabilidade celular, em células CHO-k1, demonstrou que as quatro diferentes doses de β -glucanas não interferiram nos índices de viabilidade celular, apoptose e necrose, quando comparados aos controles. Quando as associações foram realizadas nos protocolos de tratamento simultâneo simples ou com pré-incubação, verificou-se que as β -glucanas foram eficazes em diminuir o índice de apoptose e desta forma aumentar o índice de viabilidade celular. Apenas uma exceção foi verificada: a associação da β -glucana na menor dose em protocolo de tratamento simultâneo simples, apesar de permitir este raciocínio, também provocou o aumento do índice de necrose de forma estatisticamente significativa.

Segundo Fenech et al. (1999) os eventos de apoptose atuam na eliminação de células micronucleadas, reduzindo, portanto, a frequência de células com danos clastogênicos. Vukicevic et al. (2004), por sua vez apresentam duas considerações distintas entre si a este respeito. Na primeira delas os autores dizem que uma alta frequência de células em apoptose pode relacionar-se a outros danos genéticos que não resultariam na formação de micronúcleos, e assim não elevariam a sua frequência. Por outro lado, um aumento na frequência de micronúcleos e índices de apoptose normais poderiam ser explicados pela indução de supressão apoptótica nas células micronucleadas, tornando-se estas necróticas antes mesmo de passarem pela mitose.

Esta última hipótese pode auxiliar no entendimento dos resultados encontrados nesta pesquisa, já que nos protocolos de tratamento simultâneo simples e com pré-incubação, observou-se um aumento na frequência de micronúcleos sem importantes

alterações no índice de apoptose quando comparados ao controle. Contribui ainda para este entendimento o aumento do índice de necrose observado em todos os tratamentos, apesar dos mesmos não terem apresentado grandes elevações em seus números, excetuando-se a menor dose da β -glucana no protocolo de tratamento simultâneo.

O teste de viabilidade celular também foi realizado com a linhagem celular CHO-xrs5, utilizando-se os protocolos de tratamento simultâneo e pós-tratamento, visto que estes eram os dois protocolos indicados para a confirmação do mecanismo de ação do polissacarídeo em estudo. Assim, pode-se perceber que, quando se faz a comparação dos índices de viabilidade celular, apoptose e necrose, nas duas linhagens celulares, o primeiro deles não sofre uma grande variação, já que foi de 65,5% para o tipo k1 e 54,7% para o tipo xrs5. No entanto, para o índice de apoptose em xrs-5, verifica-se um valor que é quase o dobro daquele encontrado em k1, ou seja, os valores passam de 24,0 para 45,3%. Já o índice de necrose diminui cerca de 10 vezes. Desta forma, neste experimento não se verifica a mesma hipótese proposta para k1, pois o índice de apoptose não permaneceu próximo ao do controle. No protocolo de pós-tratamento verificou-se que a β -glucana foi eficiente em prevenir os danos causados pelo MMS, já que o índice de viabilidade celular aumentou quando comparado ao MMS e o de apoptose diminuiu. No entanto, estes dois parâmetros demonstram valores menores do que aqueles observados no protocolo simultâneo simples, demonstrando assim a melhor eficiência do protocolo de pós-tratamento.

Desta forma, a pesquisa de Fenech et al. (1999) é a que melhor auxilia na explicação destes dados, ou seja, o aumento de células em apoptose poderia estar diretamente

relacionado à eliminação de células micronucleadas, o que traria a redução de células com danos clastogênicos.

Porém, apesar de haver diferentes pesquisas que possam corroborar os dados encontrados neste estudo, não se pode fechar o assunto a respeito da relação entre micronúcleos e índice de apoptose, sendo necessários novos estudos que auxiliem na compreensão destes processos e suas relações.

Assim, diante dos dados apresentados, a presente pesquisa permite inferir que o polissacarídeo β -glucana possui um mecanismo de ação tanto por desmutagênese quanto por bioantimutagênese, sendo este último em menor proporção. 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.

O fato da β -glucana não ter apresentado nenhum dano genotóxico e/ou clastogênico permite sugerir o consumo da mesma, já que ela faz parte da composição de diferentes alimentos funcionais que compõem parte da dieta de uma parcela da população.

E diante de uma possível comprovação da eficiência deste polissacarídeo em prevenir danos genéticos em seres humanos e/ou a comprovação da mesma na melhoria da qualidade de vida de pessoas que possuem câncer ou que estão passando por processos de quimioterapia; a β -glucana poderá ser utilizada em larga escala na suplementação, principalmente, de pães e farináceos, que são de baixo custo e estão disponíveis para uma maior parcela da população. Ou ainda, esta substância poderá sair da classe de alimentos

funcionais e se tornar um fármaco, de origem natural, que poderá ser utilizado na forma de cápsula e/ou soluções administradas por diferentes vias.

Agradecimentos:

Esta pesquisa obteve apoio financeiro da CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

Agradecimentos a Dr. A. Levya e senhorita A.F. Silva pelo auxílio com a língua Inglesa e edição do manuscrito.

5. Referência:

Ames, B.N., Durston, W.E, Yamasaki, E., Lee, F.D., 1973. Carcinogens are mutagens.

A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2281-2285.

Chorvatovicová, D., Machová, E., Sandula, J., 1996. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity, Mutation Res. 371, 115-120.

Chorvatovicová, D., Machová, E., Sandula, J., 1998. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration, Mutation Res. 412, 83-89.

De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Res. 402, 151-8.

Demleitner, S., Kraus, J., Franz, G., 1992. Synthesis and antitumor activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan. Carbohydr. Res. 226, 247-252.

- Di Luzio, N.R., Williams, D.L., McNamee, R.B., Edwards, B.F., Kitahama, A., 1979. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucans, *Int. J. Cancer*. 24, 773-779.
- Fenech, M., Crott, J., Tuner, J., Brown, S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of method and results for hydrogen peroxide, *Mutagenesis*. 14, 605-612.
- Ferrari, C.K.B., Torres, E.A.F.S., 2002. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. *Rev. Bras. Canc.* 48, 375-382.
- Kada, T., Inoue, T., Namiki, N., 1982. Environmental desmutagens and antidesmutagens. In: Klekowski, E.J. ed. *Environ Mutag Plant Biol*. New York: Praeger;: 137-151.
- Kada, T., Shimoi, K., 1987. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. *Bio Essays*. 7, 113-115.
- Kaneno, Y., Chihara, G., Taguchi, T. 1989. Activity of lentinan against cancer and AIDS. *Int J. Immunother*. 4, 203-213.
- Kishida, E., Sone, Y., Misaki, A. 1992. Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1,3)- β -D-glucan. *Carbohydr. Polymers*. 17, 89-95.
- Lin, H., She, Y., Cassileth, B., Sirotiak, F., Rundles, S.C. 2004. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro, *Int. Immunopharmac*. 4, 91-99.
- Saitô, H., Yoshioka, Y., Ushara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., Shibata, Y., 1991. Relationship between conformation and biological response for (1,3)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated

- antitumor. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydr. Res.* 217, 181-190.
- Sandula, J., Machová, E., Hribalová, V., 1995. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana and its water-soluble derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 323-326.
- Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., Fenech, M. 2003. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques (Eds). *Mutagênese Ambiental*. ULBRA, Canoas, 2003, pp. 201-219.
- Slamenová, D., Lábaj, J., Krizková, L., Kogan, G., Sandula, J., Bresgen, N., Eckl, P., 2003. Protective effects of fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Cancer Let.* 198, 153-160.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J., eds. *Fundamentos de Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001: 756p.
- Stopper, H., Full, M., Helbig, R., Speit, G., 1997. Micronucleus induction by neocarzinostatin and methylmethanesulfonate in ionizing radiation-sensitive Chinese hamster V79 cell mutants. *Mutation Res.* 383, 107-112.
- Tohamy, A.A., El-Ghor, A.A., El-Nahas, S.M., Noshay, M.M., 2003. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin, *Mutation Res.* 541, 45-53.
- Vogel, E.W. 1982. *Assessment of chemically-induced genotoxic events: Prospectives and limitations*, Universitaire Pers, Leiden.
- Vukicevic, V., Kampfinger, K., Stopper, H. 2004. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency, *Toxicology Letters.* 147, 187-195.
- Weisburger, J.H., 2000. Eat to live, not live to eat. *Nutrition.* 16, 767-773.

Tabela 01 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes aos ensaios do micronúcleo nos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade em células CHO-k1:

Protocolo	Tratamento	Dose	Frequência de MN ¹	Números mínimo e máximo ²	X ± DP	% redução de danos
Mutagenicidade						
Tratamento de Pulso	Controle		15	4 – 6	5.00 ± 1.00	-
	MMS	37,6 µg/ml	132 ^{a*}	36 – 50	44.00 ± 7.21	-
	β-Glucana	5.0 µg/ml	9 ^a	3 – 3	3.00 ± 0.00	-
		10.0 µg/ml	12 ^a	3 – 5	4.00 ± 1.00	-
		20.0 µg/ml	18 ^a	4 – 7	6.00 ± 1.73	-
40.0 µg/ml		14 ^a	3 – 6	4.67 ± 1.53	-	
Antimutagenicidade						
Pré-Tratamento	β-Glucana + MMS	5.0 µg/ml	91 ^b	24 – 35	30.33 ± 5.69	35.0
		10.0 µg/ml	65 ^{b*}	18 – 24	21.67 ± 3.21	57.3
		20.0 µg/ml	76 ^{b*}	21 – 29	25.33 ± 4.04	47.9
		40.0 µg/ml	81 ^{b*}	26 – 29	27.00 ± 1.73	43.6
Simultâneo	β-Glucana + MMS	5.0 µg/ml	109 ^b	32 – 43	36.33 ± 5.86	19.7
		10.0 µg/ml	105 ^b	31 – 40	35.00 ± 4.58	23.1
		20.0 µg/ml	70 ^{b*}	21 – 27	23.33 ± 3.21	53.0
		40.0 µg/ml	67 ^{b*}	21 – 25	22.33 ± 2.31	55.6
Simultâneo com Pré-Incubação	β-Glucana + MMS	5.0 µg/ml	72 ^{b*}	20 – 28	24.00 ± 4.00	51.3
		10.0 µg/ml	82 ^{b*}	25 – 29	27.33 ± 2.08	42.7
		20.0 µg/ml	66 ^{b*}	26 – 26	22.00 ± 5.29	56.4
		40.0 µg/ml	76 ^{b*}	24 – 28	25.33 ± 2.31	47.9
Pós-Tratamento	β-Glucana + MMS	5.0 µg/ml	111 ^b	32 – 46	37.00 ± 7.81	17.9
		10.0 µg/ml	88 ^{b*}	26 – 32	29.33 ± 3.05	37.6
		20.0 µg/ml	95 ^{b*}	26 – 38	31.67 ± 6.03	31.6
		40.0 µg/ml	92 ^{b*}	24 – 35	30.67 ± 5.86	34.2

¹Frequência de MN (micronúcleo) por 6000 células analisadas; ²Números mínimo e máximo de MN por 6000 células analisadas; X – Valores Médios; DP – Desvio Padrão; MMS – Metilmetanosulfonato; ^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com MMS; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

Tabela 02 – Porcentagem de incremento ou decréscimo da atividade antimutagênica da β -glucana nos diferentes protocolos experimentais comparados ao protocolo de tratamento simultâneo com pré-incubação:

Tratamento	Dose de β -Glucana ($\mu\text{g/ml}$)	Protocolos		
		Pré-tratamento	Simultâneo Simples	Pós-tratamento
β -Glucana + MMS	5.0	-31.8	-61.6	-61.5
	10.0	+34.2	-45.9	-11.9
	20.0	-15.1	-6.00	-44.0
	40.0	-9.00	+16.1	-28.6

Tabela 03 – Freqüência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade nos protocolos simultâneos simples e com pré-incubação, ensaio do cometa em células CHO-k1 (Valores Médios \pm Desvio Padrão):

Tratamento	Total ¹	Classes do Cometa				Escore
		0	1	2	3	
Genotoxicidade						
Controle	15.7 \pm 7.4	81.0 \pm 5.6	12,7 \pm 6.4	2.0 \pm 1.0	1.0 \pm 1.0	19.7 \pm 8.6
MMS	95.7 \pm 3.2 ^{a*}	4,3 \pm 3.2	79.0 \pm 12.5	14.0 \pm 12.3	2,7 \pm 2.3	115.0 \pm 16.4
β_1	21.0 \pm 9.5 ^a	79.0 \pm 9.5	18,7 \pm 9.1	2.0 \pm 1.7	0,3 \pm 0.58	23.7 \pm 11.0
β_2	25.0 \pm 8.0 ^a	75.0 \pm 8.0	23,3 \pm 7.8	1.0 \pm 1.0	0,7 \pm 1.1	27.3 \pm 9.1
β_3	20.7 \pm 4.0 ^a	79,3 \pm 4.0	19.0 \pm 6.6	1,7 \pm 2.9	0.0 \pm 0.0	21.0 \pm 3.6
β_4	20.0 \pm 8.7 ^a	80.0 \pm 8.7	18,3 \pm 9.2	1,3 \pm 1.5	0,3 \pm 0.6	22.0 \pm 7.9
Antigenotoxicidade						
Protocolo de Tratamento Simultâneo Simples						
MMS + β_1	93.0 \pm 7.5 ^b	7.0 \pm 7.5	64.0 \pm 12.1	26,7 \pm 10.6	2,3 \pm 2.5	124.3 \pm 18.0
MMS + β_2	90.3 \pm 8.1 ^b	9,7 \pm 8.1	80.0 \pm 12.1	7,7 \pm 5.5	2,7 \pm 1.5	103.3 \pm 5.5
MMS + β_3	94.7 \pm 5.0 ^b	5,3 \pm 5.0	78.0 \pm 3.0	14,3 \pm 4.0	2,3 \pm 4.0	114.7 \pm 11.1
MMS + β_4	95.3 \pm 1.5 ^b	4,7 \pm 1.5	83,3 \pm 11.6	7,3 \pm 4.2	4,7 \pm 6.4	112.0 \pm 15.7
Protocolo de Tratamento Simultâneo com Pré-Incubação						
MMS + β_1	99.7 \pm 0.6 ^b	0,3 \pm 0.6	86,7 \pm 12.7	11,3 \pm 11.1	1,7 \pm 2.1	114.3 \pm 15.6
MMS + β_2	93.0 \pm 5.2 ^b	7.0 \pm 5.2	82,7 \pm 7.6	10.0 \pm 2.6	0,3 \pm 0.6	103.7 \pm 4.2
MMS + β_3	98.0 \pm 2.0 ^b	2.0 \pm 2.0	91,3 \pm 3.8	5,7 \pm 4.7	1.0 \pm 1.0	105,7 \pm 8.6
MMS + β_4	98.7 \pm 1.5 ^b	1,3 \pm 1.5	89,3 \pm 4.9	8,3 \pm 5.5	1.0 \pm 1.0	109.0 \pm 8.7

¹Número total de células lesionadas; MMS – Metilmetanosulfonato na concentração de 4,23 μ g/mL; β_1 , β_2 , β_3 , β_4 - β -Glucana nas concentrações de 5.0, 10.0, 20.0 e 40.0 μ g/ml, respectivamente; ^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com MMS; *Diferença estatisticamente significativa (Teste: t-Student; p<0,05).

Tabela 04 – Frequência de células normais, em apoptose inicial, apoptose final, necrose, índice de viabilidade celular, apoptose e necrose referentes aos protocolos de tratamento de pulso, simultâneo simples e com pré-incubação em células CHO-k1 (Valores Médios \pm Desvio Padrão):

Tratamento	Classificação dos Tipos Celulares				IVC ¹	IA ²	IN ³
	Normais	Apoptose Inicial	Apoptose Final	Necrose			
Tratamento de Pulso (3h)							
Controle	153,7 \pm 11.0	28.0 \pm 19.7	6,7 \pm 2.5	11,7 \pm 18.5	76.8	17.3	5.9
MMS	43.0 \pm 23.3	133,7 \pm 19.1	13,7 \pm 3.8	9,7 \pm 9.0	21.5 ^{a*}	73.6 ^{a*}	4.9 ^a
β_1	142,7 \pm 8.4	40.0 \pm 9.6	9,7 \pm 18.9	7,7 \pm 9.0	71.3 ^a	24.8 ^a	3.9 ^a
β_2	138.0 \pm 9.2	42,7 \pm 14.4	6,3 \pm 3.0	13.0 \pm 11.5	69.0 ^a	24.5 ^a	6.5 ^a
β_3	133,7 \pm 23.2	47.0 \pm 11.5	3.0 \pm 2.6	16,3 \pm 12.7	66.8 ^a	25.0 ^a	8.2 ^a
β_4	135,7 \pm 11.9	32,7 \pm 23.5	2,3 \pm 1.1	29,3 \pm 13.9	67.8 ^a	17.5 ^a	14.7 ^a
Tratamento Simultâneo Simples							
MMS + β_1	132,3 \pm 6.7	25,3 \pm 17.0	2.0 \pm 2.0	40,3 \pm 8.5	66.2 ^{b*}	13.7 ^{b*}	20.1 ^{b*}
MMS + β_2	123,3 \pm 19.9	59,7 \pm 23.5	4,3 \pm 2.9	12,7 \pm 9.1	61.6 ^{b*}	32.0 ^{b*}	6.4 ^b
MMS + β_3	133.0 \pm 15.6	39.0 \pm 11.1	3.0 \pm 4.4	25.0 \pm 14.0	66.5 ^{b*}	21.0 ^{b*}	12.5 ^b
MMS + β_4	131.0 \pm 7.2	41,7 \pm 9.6	6,3 \pm 2.3	21.0 \pm 10.4	65.5 ^{b*}	24.0 ^{b*}	10.5 ^b
Tratamento Simultâneo com Pré-Incubação							
MMS + β_1	126.0 \pm 17.6	49.0 \pm 31.9	1,7 \pm 1.1	23,3 \pm 21.8	63.0 ^{b*}	25.3 ^{b*}	11.7 ^b
MMS + β_2	161,3 \pm 23.6	26,3 \pm 11.9	0.0 \pm 0.0	12,3 \pm 16.3	80.6 ^{b*}	13.2 ^{b*}	6.2 ^b
MMS + β_3	146.0 \pm 43.7	26,3 \pm 9.3	2,3 \pm 2.5	15,3 \pm 21.4	78.0 ^{b*}	14.3 ^{b*}	7.7 ^b
MMS + β_4	156,0 \pm 26.7	29,7 \pm 29.8	0,3 \pm 0.6	21,3 \pm 26.6	74.3 ^{b*}	15.0 ^{b*}	10.7 ^b

¹Índice de viabilidade celular; ²Índice de Apoptose; ³Índice de Necrose; MMS – Metilmetanosulfonato na concentração de 4,23 μ g/mL; β_1 , β_2 , β_3 , β_4 - β -Glucana nas concentrações de 5.0, 10.0, 20.0 e 40.0 μ g/ml, respectivamente; ^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com MMS; *Diferença estatisticamente significativa (Teste: t-Student; p<0,05).

Tabela 05 – Frequência, variação (número mínimo e máximo), média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes aos ensaios do micronúcleo nos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade em células CHO-xrs5:

Protocolo	Tratamento	Dose	Frequência de MN ¹	Número mínimo e máximo ²	X ± DP	% redução de danos
Mutagenicidade						
Tratamento de Pulso	Controle		21	5 – 8	7.00±1.73	-
	MMS	18,8µg/mL	89 ^{a*}	26 – 32	29.67±3.21	-
	β-Glucana	40.0 µg/ml	32 ^a	10 – 11	10.67±0.58	-
Antimutagenicidade						
Tratamento Simultâneo	β-Glucana + MMS	40.0 µg/ml	62 ^{b*}	20 – 21	20.67±0.58	39.7
Pós-Tratamento	β-Glucana + MMS	40.0 µg/ml	87 ^b	24 – 34	29.00±5.00	2.96

¹Frequência de MN (micronúcleo) por 6000 células analisadas; ²Número mínimo e máximo de MN por 6000 células analisadas; X – Valores Médios; DP – Desvio Padrão; MMS – Metil-metano-sulfonato; ^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com MMS; *diferença estatisticamente significativa (Teste: Qui-quadrado).

Tabela 06 – Frequência de células normais, em apoptose inicial, apoptose final, necrose, índice de viabilidade celular e índice de apoptose referentes à mutagenicidade e antimutagenicidade nos protocolos de tratamento simultâneo simples e pós-tratamento em células CHO-xrs-5 (Valores Médios \pm Desvio Padrão):

Tratamento	Classificação dos Tipos Celulares				IVC ¹	IA ²	IN ³
	Normais	Apoptose Inicial	Apoptose Final	Necrose			
Tratamento de Pulso (3h)							
Controle	175,3 \pm 8.1	18,7 \pm 3.0	5.0 \pm 4.4	1.0 \pm 1.0	87.7	11.8	0.50
MMS	18.0 \pm 5.2	167,7 \pm 7.8	13,7 \pm 10.2	0,7 \pm 0.6	9.00 ^{a*}	90.7 ^{a*}	0.30 ^a
β_4	157.0 \pm 2.6	37,3 \pm 0.58	5,7 \pm 2.9	0.0 \pm 0.0	78.5 ^{a*}	21.5 ^{a*}	0.00 ^a
Tratamento Simultâneo Simples							
MMS + β_4	109,3 \pm 17.6	81,3 \pm 15.3	9,3 \pm 10.1	0.0 \pm 0.0	54.7 ^{b*}	45.3 ^{b*}	0.00 ^b
Pós-tratamento							
MMS + β_4	61.0 \pm 23.6	137,3 \pm 22.7	1,7 \pm 2.9	0.0 \pm 0.0	30.5 ^{b*}	69.5 ^{b*}	0.00 ^b

¹Índice de viabilidade celular; ²Índice de Apoptose; ³Índice de Necrose; MMS – Metilmetanosulfonato na concentração de 18,8 μ g/mL; β_4 - β -Glucana na concentração de 40.0 μ g/ml; ^aComparado estatisticamente com o Controle; ^bComparado estatisticamente com MMS; *Diferença estatisticamente significativa (Teste: t-Student).

Tabela 07 – Sumário dos resultados referentes aos ensaios do micronúcleo nas duas linhagens celulares:

Tratamento	Dose (μ g/ml)	Protocolo de Tratamento			
		Pré	Simultâneo	Pré-incubação	Pós
Tipo Celular – CHO-k1					
	5.0	-	-	+	-
MMS +	10.0	+	-	+	+
β -Glucana	20.0	+	+	+	+
	40.0	+	+	+	+
Tipo Celular – CHO-xrs5					
	5.0	NA	NA	NA	NA
MMS +	10.0	NA	NA	NA	NA
β -Glucana	20.0	NA	NA	NA	NA
	40.0	NA	+	NA	-

NA – Não aplicado

5. ARTIGO 3

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

Artigo a ser submetido à Revista *Reproductive Toxicology*

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

Rodrigo Juliano Oliveira¹, Maria José Sparça Salles de Faria¹, Ariane Fernanda da Silva¹, Ana Carolina dos Santos Lourenço¹, Tatiane Yumi Nakamura Kanno¹, Gabriele Antico Freiria¹, Hevenilton José Matiazi², Mário Sérgio Mantovani^{1*}

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil

²Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil

*Autor correspondente:

Telefone: +55 43-3371 4417; Fax: +55 43-3371 4527

e-mail: biomsm@uel.br

Resumo

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

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

1. Introdução

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

Os fatores genéticos constituem a causa mais comum de malformações congênitas, sendo responsáveis por cerca de um terço dos casos na espécie humana [1]. Estimativas da incidência das causas de malformações congênitas primárias destacam as aberrações cromossômicas como responsáveis por 6-7%, genes mutantes por 7-8%, fatores ambientais por 7-10%, herança multifatorial por 20-25% e 50-60% de etiologia desconhecida [2-4]. No entanto, é provável que a maioria das crianças com malformações congênitas de etiologia desconhecida tenha algum distúrbio genético [1].

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

Como vários estudos indicam uma associação inversamente proporcional entre o consumo de verduras e frutas e o desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer

[5,6], é importante testar substâncias presentes neste tipo de dieta, para se determinar a relevância desses compostos, na prevenção de efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos.

O polissacarídeo β -glucana, objeto de estudo da presente pesquisa, é um polímero de D-glicose que possui em seu esqueleto linear central ligações na posição β -(1 \rightarrow 3). Este polissacarídeo possui ainda ramificações contendo ligações β -(1 \rightarrow 6) [7].

Nenhuma referência da utilização de β -glucana em testes de prevenção de teratogenicidade foi encontrada na literatura consultada. No entanto, estudos destacam sua capacidade de prevenção de danos clastogênicos e genotóxicos frente à ciclofosfamida, cisplatina, doxorubicina e peróxido de hidrogênio [8-10]. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da β -glucana na prevenção da teratogenicidade causada por exposição aguda à ciclofosfamida e a sua capacidade antimutagênica em fêmeas prenhes e não prenhes.

2. Material e Métodos

2.1. Agente indutor de danos no DNA e teratógeno

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

2.2. Extração e preparação da β -glucana

As β -glucanas foram extraídas por autólise de *Saccharomyces cerevisiae*. Este polissacarídeo possui cadeias principais formadas por moléculas de D-glicose unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) com ramificações laterais onde estão presentes ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6). 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 finalmente secada em estufa a 40°C. Foi realizada análise em RMN (cromatografia por ressonância magnética nuclear), comprovando-se a presença de (1,3 e 1,6) β -D-glucana com pureza de 85% e, em seguida, solubilizando-se a glucana, utilizando-se DMSO (dimetil sulfóxido) mais uréia 8,0M, na proporção de 100,0mL:60,0g. Levou-se ao banho-maria, acrescentando-se 100,0mL de DMSO com 10,0mL de ácido sulfúrico concentrado e permanecendo em agitação por 4 horas a 100°C. Fez-se então a diálise com aproximadamente 100,0L de água ultra-pura (Milli-Q) e concentrou-se a solução em um evaporador rotativo a 40°C para a posterior liofilização.

A solução de β -glucana foi preparada em PBS livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7,4 e estéril. A concentração final utilizada foi de 150,0mg/Kg de peso corpóreo (i.p.).

2.3. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)* de ambos os sexos (60 fêmeas e 20 machos), em idade reprodutiva, com peso médio de 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. O experimento foi conduzido no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral. Os animais foram mantidos em caixa

de polipropileno, em dupla no caso das fêmeas e isolados no caso dos machos. Passaram por um período mínimo de adaptação correspondente a sete dias. A luminosidade e temperatura foram controladas, para tanto utilizou-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro) com temperatura mantendo-se em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. A alimentação foi constituída de água filtrada e ração comercial, *ad libitum*.

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

2.4. Ensaio de teratogenicidade

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

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

corpóreo (i.p.) de β -glucana, nos 9º, 10º e 11º dias gestacionais, e 20,0mg/kg de peso corpóreo de (i.p.) de ciclofosfamida no 10º dia gestacional.

O período gestacional prolongou-se até o 17º dia, quando as fêmeas foram submetidas à eutanásia, por deslocamento cervical, para a realização das laparotomias, já que recém-nascidos malformados ou com baixa viabilidade são freqüentemente canibalizados pelas genitoras.

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

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

Fez-se também a adequação do peso à idade da prenhez segundo a metodologia de Calderon [11]. Para este autor, os fetos podem ser classificados como: fetos com peso adequado para a idade de prenhez (PAIP) – peso compreendido entre a média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos de baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) – peso corporal inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; fetos acima do peso para a idade de prenhez (APIP) –

peso corporal superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo.

A prole dos grupos foi dividida, aleatoriamente, em dois subgrupos compostos cada um por 50% da ninhada. O primeiro foi fixado em solução de Bodian's e destinado à análise visceral. Esta análise fez-se através de cortes/microdissecção proposta por Barrow & Taylor [12] para o estudo de tórax e abdômen e pelos cortes estratégicos propostos por Wilson [13] para estudo de cabeça. A classificação das alterações viscerais baseou-se, principalmente, nos trabalhos de Taylor [14] e Manson & Kang [15] e alterações propostas por Oliveira [16]. O segundo subgrupo foi destinado à análise esquelética através da técnica de *Alizarina red* descrita por Staples & Schnell [17]. Os exames das vísceras e esqueletos fetais foram realizados em lupa estereomicroscópica. Para a comparação dos resultados quantitativos foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos (ANOVA, Kruskal-Wallis e Qui-quadrado), conforme a natureza da distribuição dos dados. Os dados qualitativos e as frequências obtidas, conforme recomenda a literatura especializada [18,19], tiveram a ninhada utilizada como unidade-base. Em todos os casos, quando $p < 0,05$, a diferença foi considerada estatisticamente significativa.

2.5. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

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

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

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

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

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

3. Resultados

3.1. Ensaio de teratogenicidade

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

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

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

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

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

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

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

As alterações de membros, anteriores e posteriores, e cauda estão apresentadas na Tabela 05. Nesta, verifica-se que as alterações de cauda ocorreram em frequências

semelhantes entre os grupos 02 e 04 (grupo 02 = 24,6%; grupo 04 = 26,6%). No entanto, para as alterações de membros verificou-se uma redução entre estes grupos (membros anteriores: grupo 02 = 100%; grupo 04 = 72,1%; membros posteriores: grupo 02 = 93,7%; grupo 04 = 64,5%). Porém, estas diferenças não são estatisticamente significativas.

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

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

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

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

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

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

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

3.2. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

A Tabela 14 apresenta a frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao teste do micronúcleo em sangue periférico. A análise estatística para o primeiro lote (fêmeas prenhes) demonstrou diferença significativa na frequência de micronúcleos, em T2 e T3, quando comparados os grupos 01 e 02, assim como quando comparados os grupos 02 e 04. Neste último caso verificaram-se porcentagens de redução de danos de 54,2 e 63,4% para os momentos T2 e T3, respectivamente. Estes dados demonstram a eficiência da β -glucana na prevenção de danos clastogênicos. Verificou-se ainda uma redução considerável na frequência de micronúcleos no momento T2 no grupo 03 quando comparado ao grupo 01.

A análise do segundo lote (fêmeas não prenhes) demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a frequência basal de micronúcleos entre

os grupos 01 e 03 no momento T0. Da mesma forma que no lote anteriormente analisado, verificaram-se diferenças significativas entre os grupos 01 e 02, e 02 e 04 nos momentos T2 e T3. Neste caso, as porcentagens de redução de danos para os momentos T2 e T3 foram de 60,4 e 42,6%, respectivamente.

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

A análise da Figura 02 demonstra o comportamento da frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento no lote de fêmeas não prenhes. Como na análise anterior, verifica-se que a associação da β -glucana à ciclofosfamida promoveu uma redução da frequência de micronúcleos. Porém, neste grupo, a administração da β -glucana sozinha não reduziu os níveis basais de danos ao DNA.

Na Figura 03 está apresentada a comparação da frequência de micronúcleos entre os dois diferentes lotes, fêmeas prenhes e não prenhes, durante o período experimental. A análise de T0 demonstra que o nível basal da frequência de micronúcleos em todos os grupos experimentais, independentemente da gestação, era semelhante. A

administração de ciclofosfamida, que pode ser avaliada em T2 e T3, demonstra uma maior susceptibilidade do lote de fêmeas prenhes em comparação com as não prenhes. A maior susceptibilidade a danos no DNA pode novamente ser verificada entre as fêmeas prenhes para o tratamento no qual se faz a associação de ciclofosfamida e β -glucana no momento T2.

4. Discussão

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

Diferentes protocolos foram desenvolvidos para a prevenção de teratogenicidade induzida por ciclofosfamida e efeitos preventivos foram encontrados em proles que tiveram suas genitoras tratadas com extrato de sangue bovino livre de proteínas, conhecido como Solcoseryl [21]; β -ionona nas doses de 250,0, 500,0, 750,0 e 1000,0mg/kg de peso corpóreo [22]; e Indole-3-carbinol na dose de 100,00mg/kg de peso corpóreo, v.o. [23].

O presente protocolo utilizou fêmeas expostas ao quimiopreventivo por um período de 3 dias e a exposição ao quimioterápico deu-se somente no segundo dia. Assim pretendeu-se, neste protocolo experimental, conciliar um pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento da β -glucana em relação à ciclofosfamida. Escolheu-se esta forma de administração devido a estudos *in vitro*, do mesmo grupo de pesquisa, dados não apresentados, indicarem que este polímero de D-glicose possui atividade antimutagênica,

sendo o mecanismo de ação caracterizado tanto por desmutagênese quanto por bioantimutagênese. Desta forma, este protocolo permitiria uma melhor efetividade na prevenção da teratogênese e dos efeitos mutagênicos.

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

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

As figuras apresentadas a respeito do comportamento da frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento demonstram os resultados esperados, ou seja, a redução de danos quando da administração da β -glucana associada à ciclofosfamida. No lote de fêmeas prenhes foi possível verificar uma redução considerável da frequência de micronúcleos basais, apesar desta não ser estatisticamente significativa, no grupo que recebeu somente a β -glucana. Esta condição sugere novos estudos a respeito da possibilidade deste polissacarídeo ser utilizado na suplementação de dietas a fim de diminuir riscos, basais e/ou induzidos, do desenvolvimento do câncer. Esta possibilidade pode ser reforçada pela verificação da ausência de danos mutagênicos causados pela dose testada segundo este protocolo. Outro fato interessante a ser mencionado é que β -glucanas, extraídas de fungos, têm sido utilizadas clinicamente no Japão desde a década de 80 na prevenção de cânceres [24]. Charvatovicová et al. [25] ainda indicam a importância de se estudar a administração deste polímero de açúcar concomitantemente aos procedimentos de quimioterapias, devido à possibilidade da redução de efeitos adversos desta prática terapêutica. No entanto, ainda são muito controversos os princípios moleculares e bioquímicos envolvidos na atividade antitumoral, antimutagênica e imunoestimulatória das diferentes β -glucanas [26-28].

Quando se compara a frequência de micronúcleos entre os dois grupos (fêmeas prenhes e não prenhes) verifica-se que a frequência basal é semelhante. No entanto, as diferenças estatisticamente significativas verificadas nos grupos 02 e 04 em T2 e T3

sugerem uma maior susceptibilidade das fêmeas grávidas frente à indução de micronúcleos. Uma hipótese a ser aventada é que o estado de gravidez leva o organismo materno a uma condição de maior atividade metabólica, e, por conseguinte, a uma maior atividade hepática. Outro fato a ser considerado são as alterações hormonais decorrentes da gravidez. Assim, diante destas duas constatações, faz-se necessário compreender um pouco mais da relação entre aumento de metabolismo, estado de gravidez e enzimas responsáveis pela degradação de xenobióticos.

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

Muitos xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia de doenças podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas [29]. Uma vez que muitos agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos necessitam de ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, ao RNA e às proteínas [30], as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham papel crucial na tumorigênese

ambiental [31]. Portanto, a quantidade final efetiva de carcinógenos produzida, depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas [32]. Além disso, pode-se sugerir que a β -glucana possa ter uma atividade auxiliar ou complementar ao sistema de metabolização de drogas na célula e por isso também facilitariam a excreção dos produtos o que viria a diminuir os danos causados por estes no organismo em estudo.

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

Corroborar a hipótese anterior o trabalho de Slameňová et al. [8] onde investigaram o efeito protetor de três diferentes extratos de β -glucana, em três diferentes concentrações, em danos induzidos por peróxido de hidrogênio e azul de metileno na presença de luz visível demonstrando o efeito antioxidante. O estudo de Patchen et al. [33] indica efeitos benéficos quando utilizaram β -glucana em animais submetidos à radiação. De acordo com seu estudo, a melhora não se deve somente à regeneração hematopoiética, mas também à capacidade deste polissacarídeo de inativar radicais livres, que poderiam causar danos ao organismo em teste. Estes resultados também estão em concordância com o trabalho de Chorvatovicová [34].

A metabolização da ciclofosfamida pelo sistema enzimático citocromo P450 tem como produto a 4-hidroxíciclofosfamida, a qual é degradada, espontaneamente, a mustarda fosforamida e acroleína [35]. A mustarda fosforamida é um conhecido agente alquilante envolvido em processos citotóxicos e com propriedades teratogênicas. A acroleína, por sua vez, está descrita como um potente agente embriotóxico [35,36]. Assim, podemos dizer que os metabólitos da ciclofosfamida produzem efeitos adversos no desempenho reprodutivo da fêmea e no desenvolvimento de sua prole. O presente trabalho permitiu verificar que não houve diferenças significativas para o número de implantes, número de fetos vivos, razão sexual e índice placentário. Como os tratamentos aconteceram somente em uma parte do período de organogênese, não era esperada nenhuma alteração no número de implantes, fato que foi verificado. Nenhuma descrição foi encontrada, na literatura pesquisada, onde fossem relatadas alterações em diferenciação sexual e exposição à ciclofosfamida e/ ou β -glucana.

O peso placentário mostrou-se diminuído no grupo 02 em relação aos demais. No entanto, o índice placentário não demonstrou esta diferença. Estudos indicam aumento do peso placentário em ratas diabéticas [37-40]. Os efeitos do diabetes materno sobre a arquitetura e o fluxo placentários [41] sugerem que o feto desenvolve-se em regime de hipóxia e má nutrição. O aumento da placenta favoreceria o aporte de oxigênio e nutrientes, aumentando a superfície de troca materno-fetal. Contudo, no presente experimento, não foi observado um aumento do índice placentário nos grupos em relação ao controle. Mas observou-se uma drástica redução do peso placentário no grupo que recebeu somente a ciclofosfamida. Durante os procedimentos de onfalectomia verificou-se que o aporte sanguíneo era muito reduzido nos fetos que tiveram suas genitoras tratadas somente com

ciclofosfamida ou associada a β -glucana (dados não apresentados). Estes fatos podem sugerir uma má nutrição fetal não relacionada ao aumento do índice placentário, fatos que não são corroborados pela literatura já apresentada. No entanto, corrobora esta inferência de má nutrição a diminuição estatisticamente significativa verificada no peso e comprimento fetal destes dois grupos experimentais. Ainda reforça este achado o estudo da adequação do peso à idade gestacional, que demonstrou que a administração da ciclofosfamida, independentemente da β -glucana, foi a responsável pelos fetos coletados que apresentaram-se com baixo peso para a idade de prenhez. Assim, estes dados sugerem que a β -glucana não teve nenhuma interferência nestes parâmetros.

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

Os estudos de malformações viscerais indicam que no polo cefálico a associação da β -glucana foi eficiente em prevenir alterações de ventrículos laterais e que a administração deste polissacarídeo, isoladamente, foi capaz de prevenir a ocorrência basal de alterações em terceiro e quarto ventrículos cerebrais.

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

Por outro lado, a análise da região urogenital demonstra prevenção da ocorrência de megaureteres e hidronefrose. Alterações tais como rim em ferradura, agenesia renal e

gonadal só foram encontradas no grupo que recebeu a ciclofosfamida e a β -glucana. A análise esquelética demonstrou prevenção de alterações somente em mandíbula, clavícula e pelve.

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

Outros estudos relatam que os efeitos teratogênicos causados pela ciclofosfamida podem ser atenuados quando um tratamento com substâncias que inibem as cascatas metabólicas é utilizado. Algumas dessas substâncias são, por exemplo, a β -ionona e Indole-3-Carbionol [22,23]. Assim, a presente pesquisa pode sugerir que apesar dos efeitos anticlastogênicos evidenciados, a efetividade da β -glucana em inibir as vias metabólicas que envolvem a CYP e/ou sua capacidade em se ligar à ciclofosfamida, aos seus metabólitos e/ou de quelar radicais livres ocorreu de forma eficiente no organismo materno, mas não nos embriões. Contudo, ainda não temos dados que indiquem se a β -glucana, metabolizada ou não, foi capaz de atravessar, de forma eficiente e suficiente, a barreira placentária para inativar os processos desencadeados pela ciclofosfamida nos embriões.

Assim, os presentes relatos indicam que a β -glucana possui baixo potencial na prevenção da teratogênese. No entanto, esta parece ser um efetivo polissacarídeo na proteção de danos ao material genético. O fato da administração deste polissacarídeo não estar relacionada ao aparecimento de efeitos adversos e sim à redução basal da frequência

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

Agradecimentos:

Esta pesquisa obteve apoio financeiro da CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

Agradeimentos a Dr. A. Levy e as senhoritas T.Y.N. Kanno e A.C.S. Lourenço pelo auxílio com a língua Inglesa e edição do manuscrito.

5. Referência:

- [1] Moore BA, Persaud TVN. eds. Embriologia básica. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- [2] Connor JM, Ferguson-Smith MA. eds. Essential medical genetics. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1987.
- [3] Persaud TVN. ed. Environmental causes of human birth defects. Springfield: Charles C Thomas; 1990.
- [4] Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. eds. Thompson & Thompson genetics in medicine. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
- [5] Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet, Mutation Res. 1994; 307: 395-410.

- [6] Flagg EW, Coates RJ, Greenberg RS. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans, *J. Am. Coll. Nutr.* 1995; 14: 419-27.
- [7] Di Luzio NR, Williams DL, McNamee RB, Edwards BF, Kitahama A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucans, *Int. J. Cancer.* 1979; 24: 773-9.
- [8] Slamenová D, Lábaj J, Krizková L, Kogan G, Sandula J, Bresgen N, Eckl P. Protective effects of fungal (1→3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Cancer Let.* 2003; 198: 153-60.
- [9] Tohamy AA, El-Ghor AA, El-Nahas SM, Noshay MM. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin, *Mutation Res.* 2003; 541: 45-53.
- [10] Lin H, She Y, Cassileth B, Sirotiak F, Rundles SC. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro, *Int. Immunopharmac.* 2004; 4: 91-9.
- [11] Calderon, IPM. Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabetes e gravidez. [Dissertação de Mestrado] – Botucatu, SP: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Paulista, 1988.
- [12] Barrow MV, Taylor WI. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. *J. Morphol.* 1969; 127: 291-306.
- [13] Wilson J.G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J. eds. *Teratology: principles and techniques.* Chicago: The University of Chicago Press; 1965.

- [14] Taylor, P. ed. *Practical teratology*. New York: Academic Press; 1986.
- [15] Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayves, A.W. ed. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press; 1994.
- [16] Oliveira R J. Possível efeito do tratamento de ratas prenhes com doses altamente diluídas de arsênio na prevenção da teratogenicidade deste metal. 2001. 233f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- [17] Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol.* 1964; 39: 61-3.
- [18] Manson JM, Zenick H, Costlow RD. *Teratology test methods for laboratory animals*. In: Hayves AW. ed. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press; 1982.
- [19] Hanseman JK, Hogan MD. Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology.* 1995; 12: 165-72.
- [20] Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate Jr M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* 1990; 245: 245-9.
- [21] Shubert J. Prevention of experimentally induced cleft palate in mice. *Cleft Palate J.* 1982; 19: 83-8.

- [22] Gomes-Carneiro MR, De-Oliveira ACAX, De-Carvalho RR, Araújo IB, Souza CAM, Kuriyama SN, Paumgarten FJR. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by β -ionone. *Toxicology Letters*. 2003; 205-13.
- [23] Bailey MM, Sawyer RD, Behling JE, Boohaker JG, Hicks JG, O'Donnell MA, Stringer KR, Rasco JF, Hood RD. Incidence of specific cyclophosphamide-induced developmental defects in mice. *Birth Defects Res*. 2005; 74: 261-7.
- [24] Kaneno Y, Chihara G, Taguchi T. Activity of lentinan against cancer and AIDS. *Int J. Immunother*. 1989; 4: 203-13.
- [25] Chorvatovicová D, Machová E, Sandula J. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration, *Mutation Res*. 1998; 412: 83-9.
- [26] Kishida E, Sone Y, Misaki A. Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1,3)- β -D-glucan. *Carbohydr. Polymers*. 1992; 17: 89-95.
- [27] Saitô H, Yoshioka Y, Ushara N, Aketagawa J, Tanaka S, Shibata Y. Relationship between conformation and biological response for (1,6)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated antitumor. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydr. Res*. 1991; 217: 181-90.
- [28] Demleitner S, Kraus J, Franz G. Synthesis and antitumor activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan. *Carbohydr. Res*. 1992; 226: 247-52.
- [29] Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmac. Ther*. 1993; 57: 129-160.

- [30] Rogers AS. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. *J. Adolescent Health*. 1994; 15: 635-40.
- [31] Bartsch H, Hieten E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ. Health Perspect*. 1996; 104: 569-77.
- [32] Hayes RB. Genetic susceptibility and occupational cancer. *Med. Lav*. 1995; 86: 206-13.
- [33] Patchen ML, D'Alesandro MM, Brook I, Blakely WF, Mac Vittie TJ. Glucan: mechanisms involved in its radioprotective effect, *J. Leukocyte Biol*. 1987; 42: 95-105.
- [34] Chorvatovicová D. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co⁶⁰ in mice, *Strahlenther. Onkol*. 1991; 167: 612-4.
- [35] Mirkes PE. Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratog. Carcinog. Mutag*. 1985; 5: 75-88.
- [36] Stahlmann R, Bluth U, Neubert, D. Effects of the cyclophosphamide metabolite acrolein in mammalian limb bud cultures. *Arch. Toxicol*. 1985; 57: 163-7.
- [37] Eriksson UJ, Dahlström E, Larsson KS, Hellerström, C. Increased incidence of congenital malformations in the offspring of diabetic rats and their prevention by maternal insulin therapy. *Diabetes*. 1982; 31:1-6.
- [38] Uriu-Hare J, Stern JS, Reaven, GM, Keen CL. The effect of maternal diabetes on trace element status and fetal developmental in the rat. *Diabetes*. 1985; 35:1031-40.
- [39] Eriksson RSM, Thunberg L, Eriksson UJ. Effects of interrupted insulin treatment on fetal outcome of pregnant diabetic rats. *Diabetes*. 1989; 38: 764-72.
- [40] Giavini E, Broccia ML, Prati M, Roversi GD, Vismara C. Effects of streptozotocin-induced diabetes on fetal developmental of the rat. *Teratology*. 1986; 34: 81-8.

- [41] Eriksson UJ, Jansson L. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal developmental in the rat. *Int. Ped. Res.* 1984; 18: 735-8.

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

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

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

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

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

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

Tabela 03 – Parâmetros relativos à fertilidade e desenvolvimento fetal.

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Nº de implantes¹</i>	11,10±3,31 ^a	12,80±3,26 ^a	10,30±3,65 ^a	12,90±2,78 ^a
<i>Fetos vivos¹</i>	8,90±3,28 ^a	4,50±3,84 ^a	8,00±3,13 ^a	7,70±4,97 ^a
<i>Viabilidade fetal¹</i>	100,0±0,00 ^a	65,71±44,29 ^b	100,00±0,00 ^{a,b}	92,20±17,16 ^{a,b}
<i>TPPI²</i>	8,68±14,84 ^a	70,56±33,57 ^b	16,89±18,20 ^a	31,70±36,17 ^{a,b}
<i>TR²</i>	8,68±14,84 ^a	62,34±32,40 ^b	16,13±16,96 ^a	30,96±35,71 ^{a,b}
<i>Razão Sexual²</i>	71,7±87,9 ^a	62,5±75,0 ^a	98,7±101,4 ^a	90,7±69,3 ^a
<i>PP (g)¹</i>	0,12±0,02 ^a	0,04±0,01 ^b	0,12±0,02 ^a	0,11±0,16 ^{a,b}
<i>IP²</i>	0,08±0,02 ^a	0,07±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a
<i>Peso fetal (g)¹</i>	1,44±0,19 ^a	0,65±0,04 ^b	1,38±0,15 ^a	0,67±0,11 ^b
<i>CF (cm)¹</i>	2,59±0,18 ^a	1,61±0,09 ^b	2,56±0,13 ^a	1,61±0,14 ^b
<i>APIP</i>		BPIP	PAIP	BPIP

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

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

Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
		Polo cefálico – Terço superior			
Cabeça					
<i>Número de Fetos Analisados</i>		42	13	38	35
<i>Número de Fetos Normais</i>		42	4	38	17
<i>Exencefalia Leve</i>		0	0	0	0
<i>Exencefalia Moderada</i>		0	1	0	1
<i>Exencefalia Severa</i>		0	2	0	6
<i>Acrania Real</i>		0	0	0	6
<i>Displasia Ectodérmica</i>		0	6	0	8
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	9^{a*}	0	18^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	75,4±17,5	0,00±0,00	45,8±43,8
Olhos					
<i>Exoftalmia Unilateral</i>		0	0	0	3
<i>Exoftalmia Bilateral</i>		0	8	0	19
<i>Aberto Unilateral</i>		0	1	0	5
<i>Aberto Bilateral</i>		0	2	0	3
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	11^{a*}	0	27^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	90,2±20,0	0,00±0,00	58,8±35,6
Polo cefálico – Terço inferior					
<i>Orelha Normal</i>		42	6	38	24
<i>Orelha BI</i>		0	7 ^{a*}	0	11 ^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	38,7±44,8	0,00±0,00	38,4±40,6
<i>Mandíbula e Maxila Normal</i>		42	4	38	20
<i>Mandíbula e Maxila Retrom</i>		0	9 ^{a*}	0	15 ^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	72,9±35,6	0,00±0,00	53,1±28,3
<i>Fenda Lábio-Palatal Normal</i>		42	12	38	35
<i>Fenda Lábio-Palatal Unilateral</i>		0	1	0	2
<i>Fenda Lábio-Palatal Bilateral</i>		0	0	0	2
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	1^a	0	4^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	5,00±10,0	0,00±0,00	9,26±18,8
<i>Língua Normal</i>		42	4	38	20
<i>Língua Protusa</i>		0	9 ^{a*}	0	15 ^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	72,9±35,6	0,00±0,00	53,1±28,3

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; BI – Baixa implantação de orelha; Retrom - Retromicrognatismo. ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01);

^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

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

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

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

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

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Patás Anteriores				
Pata Anterior Direita				
<i>Número de Fetos Analisados</i>	42	13	38	35
<i>Número de dedos</i>				
<i>Normais</i>	42	5	38	14
<i>Oligodactilia</i>	0	7	0	21
<i>Polidactilia</i>	0	1	0	0
<i>Sindactilia</i>	0	5	0	8
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	8^{a*}	0	21^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	80,4±14,2	0,00±0,00	77,8±26,2
Pata Anterior Esquerda				
<i>Número de dedos</i>				
<i>Normais</i>	42	5	38	15
<i>Oligodactilia</i>	0	8	0	20
<i>Polidactilia</i>	0	0	0	0
<i>Sindactilia</i>	0	5	0	11
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	8^{a*}	0	20^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	80,4±14,2	0,00±0,00	76,2±26,1
Patás Posteriores				
Pata Posterior Direita				
<i>Número de dedos</i>				
<i>Normais</i>	42	7	38	17
<i>Oligodactilia</i>	0	0	0	4
<i>Polidactilia</i>	0	6	0	14
<i>Sindactilia</i>	0	6	0	17
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	6^{a*}	0	18^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	65,8±29,9	0,00±0,00	72,5±29,7
Pata Posterior Esquerda				
<i>Número de dedos</i>				
<i>Normais</i>	42	8	38	19
<i>Oligodactilia</i>	0	0	0	3
<i>Polidactilia</i>	0	5	0	13
<i>Sindactilia</i>	0	5	0	18
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	5^{a*}	0	16^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	60,8±28,3	0,00±0,00	69,5±30,9

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

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

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Cérebro – Hidrocefalia				
<i>Número de Fetos Analisados</i>	42	13	38	35
<i>Número de Fetos Normais</i>	19	1	29	8
<i>Ventrículos Leve</i>	10	0	1	0
<i>Laterais Moderado</i>	8	2	8	4
<i>Severo</i>	5	10	0	23
<i>Freq. Total de Malformações</i>	23	12^{a*}	9^{a*}	27^{b*}
<i>%MF</i>	58,4±25,8	95,0±10,0	43,7±37,3	80,2±24,5
<i>Número de Fetos Normais</i>	33	1	37	8
<i>Terceiro Leve</i>	2	0	0	0
<i>Ventrículo Moderado</i>	3	2	1	3
<i>Severo</i>	4	10	0	24
<i>Freq. Total de Malformações</i>	9	12^{a*}	1^{a*}	27^b
<i>%MF</i>	30,0±40,5	95,0±10,0	3,33±10,5	80,2±24,5
<i>Número de Fetos Normais</i>	33	1	35	8
<i>Quarto Leve</i>	2	0	0	0
<i>Ventrículo Moderado</i>	3	2	3	3
<i>Severo</i>	4	10	0	24
<i>Freq. Total de Malformações</i>	9	12^{a*}	3^a	27^b
<i>%MF</i>	30,4±40,5	95,0±10,0	20,0±32,2	80,2±24,5
Olhos				
<i>Número de Fetos Normais</i>	42	12	38	34
<i>Microftalmia</i>	0	1 ^a	0	1 ^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	6,25±12,5	0,00±0,00	3,70±11,1

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

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

Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
Região Torácica					
<i>Número de Fetos Analisados</i>		42	13	38	35
<i>Coração</i>	<i>Normal</i>	42	13	36	35
	<i>Cardiomeg.</i>	0	0	2 ^a	0
%MF		0,00±0,00	0,00±0,00	3,67±7,78	0,00±0,00
Região Urogenital					
<i>Rins – Anat. Externa</i>	<i>Normal</i>	42	13	38	34
	<i>Rim Ferrad.</i>	0	0 ^a	0	1 ^b
%MF		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,39±4,14
<i>Ureteres</i>	<i>Normal</i>	42	3	36	28
	<i>Megauret.</i>	0	10 ^{a*}	2 ^a	7 ^{b*}
%MF		0,00±0,00	81,7±21,3	3,67±7,78	10,3±20,6
<i>Rins – Anat. Interna</i>	<i>Normal</i>	40	1	32	12
	<i>Hidronefroze</i>	2	12 ^{a*}	6 ^a	23 ^{b*}
%MF		2,86±9,04	91,7±16,6	16,0±27,1	54,6±37,1
<i>Número de Fetos Normais Agenesia Renal</i>		42	13	38	32
		0	0	0	3 ^b
%MF		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	20,4±35,1
<i>Número de Fetos Normais Agenesia Gonadal</i>		42	13	38	34
		0	0	0	1 ^b
%MF		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,56±16,7

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

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

Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos Analisados</i>		46	20	42	39
<i>Mandíbula</i>	<i>Normal</i>	46	14	42	8
	<i>Irregular</i>	0	1	0	31
	<i>Oss. Red.</i>	0	5	0	0
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	6^{a*}	0	31^{b*}
<i>%MF</i>		0,00±0,00	82,5±32,2	0,00±0,00	78,7±28,3
<i>Maxila</i>	<i>Normal</i>	46	11	42	13
	<i>Irregular</i>	0	8	42	26
	<i>Oss. Red.</i>	0	1	0	0
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	9^{a*}	0	26^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	63,6±41,3	0,00±0,00	80,5±30,0
<i>Pterigóide</i>	<i>Normal</i>	46	5	42	5
	<i>Irregular</i>	0	7	0	10
	<i>Ausente</i>	0	8	0	24
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	15^{a*}	0	34^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	88,6±30,2	0,00±0,00	98,2±5,06
<i>Basosfenóide</i>	<i>Normal</i>	46	2	42	5
	<i>Irregular</i>	0	9	0	11
	<i>Ausente</i>	0	9	0	9
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	18^{a*}	0	34^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	95,9±11,7
<i>Hióide</i>	<i>Normal</i>	46	1	42	3
	<i>Reduzido</i>	0	1	0	0
	<i>Ausente</i>	0	18	0	36
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	19^{a*}	0	36^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	95,3±12,5	0,00±0,00	100±0,00
<i>Bulba Timpânica</i>	<i>Normal</i>	46	1	42	3
	<i>Irregular</i>	0	2	0	0
	<i>Ausente</i>	0	17	0	36
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	19^{a*}	0	36^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	96,4±9,40	0,00±0,00	98,2±5,06
<i>Basoccipital</i>	<i>Normal</i>	46	2	42	4
	<i>Irregular</i>	0	4	0	9
	<i>Ausente</i>	0	14	0	26
<i>Freq. Total de Malformações</i>		0	18^{a*}	0	35^b
<i>%MF</i>		0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	100±0,00

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

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

Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos Analisados</i>		46	20	42	39
<i>Exoccipital</i>	<i>Normal</i>	46	2	0	4
	<i>Irregular</i>	0	1	0	2
	<i>Ausente</i>	0	17	0	33
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	18^{a*} 91,7±14,3	0 0,00±0,00	35^b 100±0,00
<i>Nasal</i>	<i>Normal</i>	46	13	42	26
	<i>Irregular</i>	0	4	0	0
	<i>Ausente</i>	0	3	0	13
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	7^{a*} 30,7±36,8	0 0,00±0,00	13^b 83,8±31,1
<i>Zigomático</i>	<i>Normal</i>	46	3	42	7
	<i>Irregular</i>	0	5	0	12
	<i>Ausente</i>	0	12	0	20
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	17^{a*} 88,1±15,0	0 0,00±0,00	32^b 94,6±15,2
<i>Frontal</i>	<i>Normal</i>	46	2	42	4
	<i>Exencefalia</i>	0	5	0	31
	<i>Irregular</i>	0	10	0	4
	<i>Ausente</i>	0	3	0	0
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	18^{a*} 95,3±12,5	0 0,00±0,00	35^b 83,6±30,3
<i>Parietal</i>	<i>Normal</i>	46	0	42	0
	<i>Exencefalia</i>	0	5	0	35
	<i>Irregular</i>	0	6	0	6
	<i>Ausente</i>	0	9	0	2
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 96,4±9,50	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00
<i>Interparietal</i>	<i>Normal</i>	46	1	42	6
	<i>Irregular</i>	0	6	0	5
	<i>Ausente</i>	0	13	0	28
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	19^{a*} 96,4±9,45	0 0,00±0,00	33^b 96,4±10,1
<i>Supraoccipital</i>	<i>Normal</i>	46	1	42	0
	<i>Irregular</i>	0	8	0	13
	<i>Ausente</i>	0	11	0	26
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	19^{a*} 96,4±9,45	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00

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

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

Parâmetros	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos Analisados</i>	46	20	42	39
<i>Normal</i>	46	1	35	0
<i>Nº Est. Anor.</i>	0	3	7	4
<i>Esterno</i>				
<i>Est. Oss. Red.</i>	0	1	0	5
<i>Est. Desal.</i>	0	5	0	1
<i>Est. Fund.</i>	0	10	0	23
<i>Ausentes</i>	0	0	0	6
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	19^{a*}	7^{a*}	39^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	96,4±9,45	17,5±33,4	100±0,00
<i>Normal</i>	46	8	42	9
<i>Nº Vert. Anor.</i>	0	2	0	0
<i>Vert. Desal.</i>	0	1	0	3
<i>Vert. Irregular</i>	0	9	0	13
<i>Vert. Fund</i>	0	0	0	14
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	12^{a*}	0	30^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	85,0±30,1	0,00±0,00	92,5±21,2
<i>Normal</i>	46	1	42	6
<i>Costelas</i>				
<i>Nº Cost. Anor.</i>	0	12	0	28
<i>Rudimentar</i>	0	3	0	5
<i>Ausentes</i>	0	4	0	0
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	19^{a*}	0	33^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	98,2±5,06
<i>Normal</i>	46	2	42	17
<i>Clavícula</i>				
<i>Irregular</i>	0	4	0	9
<i>Ausente</i>	0	13	0	13
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	18^{a*}	0	22^{b*}
<i>%MF</i>	0,00±0,00	91,7±14,3	0,00±0,00	84,1±32,1
<i>Normal</i>	46	0	42	8
<i>Escápula</i>				
<i>Irregular</i>	0	10	0	27
<i>Ausente</i>	0	10	0	4
<i>Freq. Total de Malformações</i>	0	20^{a*}	0	31^b
<i>%MF</i>	0,00±0,00	100±0,00	0,00±0,00	96,9±8,84

Legenda: Freq. – Frequência; %MF – Valor médio da porcentagem de malformações ± Desvio padrão; Nº Est. Anor. – Número de esternibras anormais; Est. Oss. Red. – Esternebras com ossificação reduzida; Est. Desal. – Esternebra desalinhada; Est. Fund. – Esternebras Fundidas; Nº Vert. Anor. – Número de vértebras anormais; Vert. Desal – Vértebras desalinhadas; Vert. Fund. – Vértebras Fundidas; Nº Cost. Anor. – Número de costelas anormais; ^aComparado estatisticamente com o controle (Grupo 01); ^bComparado estatisticamente com o agente indutor de danos (Grupo 02); *Diferença estatisticamente significativa. (Teste: Qui-quadrado; p<0,05).

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

Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos Analisados</i>		46	20	42	39
<i>Normal (D / E)</i>		46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
<i>Symmelia</i>		0	13 / 12	0 / 0	30 / 30
<i>Rádio, Úmero e Ulna</i>	<i>Irregular</i>	0	3 / 2	0 / 0	9 / 9
	<i>Amelia</i>	0	1 / 2	0 / 0	0 / 0
	<i>Ausência</i>	0	2 / 3	0 / 0	0 / 0
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00
<i>Metacarpos</i>					
<i>Normal (D / E)</i>		46	3 / 3	42 / 42	7 / 7
<i>Anormal</i>		0	9 / 9	0 / 0	17 / 17
<i>Ausência</i>		0	7 / 7	0 / 0	15 / 15
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	17^{a*} 98,2±4,72	0 0,00±0,00	32^b 100±0,00
<i>Falanges Proximais</i>					
<i>Normal (D / E)</i>		46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
<i>Anormal</i>		0	12 / 12	0 / 0	16 / 16
<i>Ausência</i>		0	8 / 8	0 / 0	23 / 23
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00
<i>Falanges Distais</i>					
<i>Normal (D / E)</i>		46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
<i>Anormal</i>		0	12 / 12	0 / 0	0 / 0
<i>Irregular</i>		0	1 / 1	0 / 0	0 / 0
<i>Ausência</i>		0	16 / 16	0 / 0	39 / 39
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00

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

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

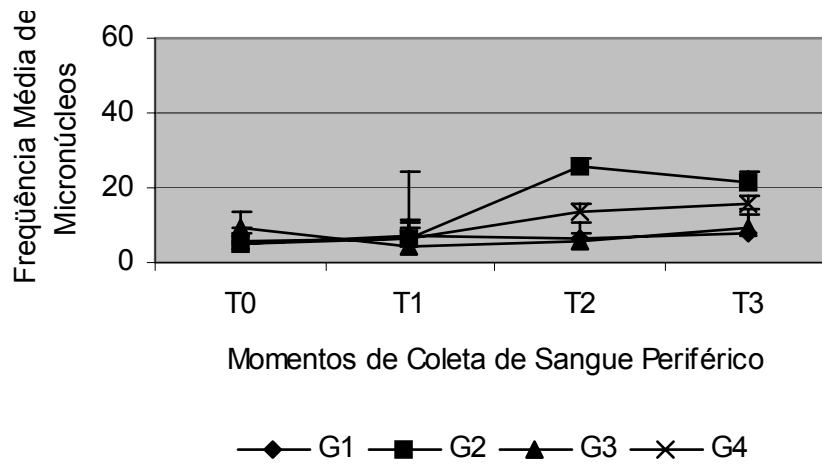
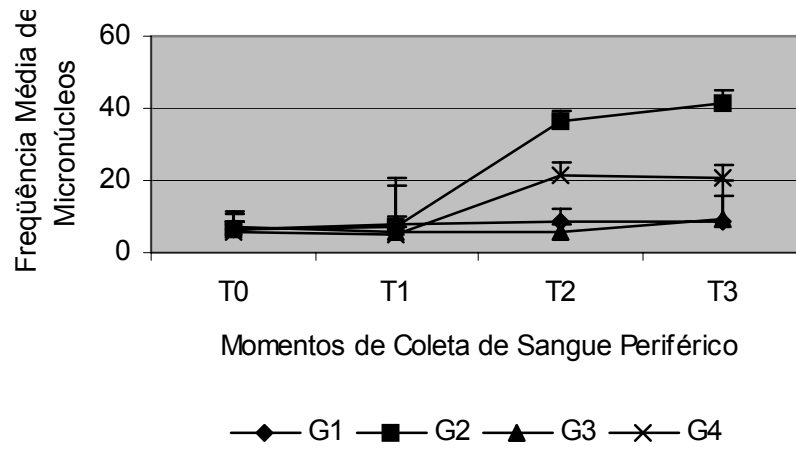
Parâmetros		Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
<i>Número de Fetos Analisados</i>		46	20	42	39
<i>Normal</i>		46	6	0	29
<i>Íleo, Ísquio e Púbis</i>	<i>Oss. Red.</i>	0	2	0	0
	<i>Irregular</i>	0	0	0	1
	<i>Aus. 1 ou +</i>	0	4	0	3
	<i>Ausência</i>	0	7	0	6
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	14^{a*} 90,0±19,1	0 0,00±0,00	10^{b*} 52,5±51,2
<i>Tíbia, Fíbula e Fêmur</i>	<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	<i>Symmelia</i>	0	1 / 1	0 / 0	15 / 15
	<i>Fusão</i>	0	8 / 9	0 / 0	3 / 4
	<i>Oss. Red. 1 ou +</i>	0	1 / 3	0 / 0	0 / 0
	<i>Aus. 1 ou +</i>	0	10 / 7	0 / 0	21 / 20
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00
<i>Metatarsos</i>	<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	<i>Anormal</i>	0	18 / 18	0 / 0	39 / 39
	<i>Ausência</i>	0	2 / 2	0 / 0	0 / 0
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00
<i>Falanges Proximais</i>	<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	<i>Anormal</i>	0	15 / 15	0 / 0	3 / 3
	<i>Ausência</i>	0	5 / 5	0 / 0	36 / 36
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00
<i>Falanges Distais</i>	<i>Normal (D / E)</i>	46	0 / 0	42 / 42	0 / 0
	<i>Anormal</i>	0	5 / 5	0 / 0	3 / 3
	<i>Ausência</i>	0	15 / 15	0 / 0	36 / 36
<i>Freq. Total de Malformações %MF</i>		0 0,00±0,00	20^{a*} 100±0,00	0 0,00±0,00	39^b 100±0,00

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

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

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

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



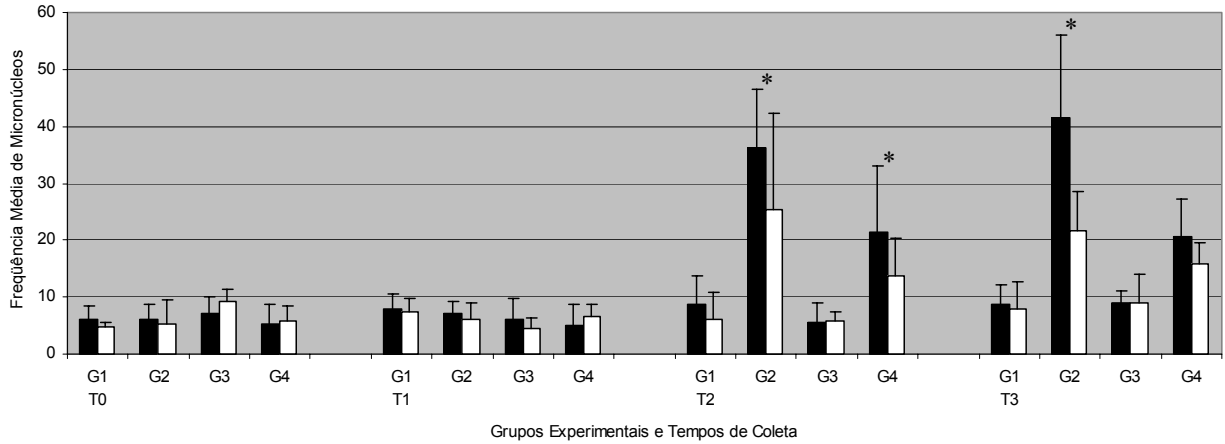


Figura 03 – Comparação da frequência de micronúcleos entre os dois diferentes lotes, fêmeas prenhes e não prenhes, durante o período experimental: Legenda: Barras pretas – fêmeas prenhes; barras brancas – fêmeas não prenhes. Momentos T0, T1, T2 e T3 coletas de sangue realizadas no 9º, 10º, 11º e 12º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

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante aos resultados apresentados considera-se que o polissacarídeo β -glucana:

- ✓ Não apresenta potencial genotóxico em sistema-teste *in vitro*;
- ✓ Não apresenta potencial mutagênico em sistemas-teste *in vitro* e *in vivo*, excetuando a dose de 20,0 μ g/mL em sistema de cultura tratadas com β -glucana originária da cevada;
- ✓ Possui capacidade quimiopreventiva em relação tanto a agentes de ação direta como indireta *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ De acordo com os protocolos testados, *in vitro*, possui mecanismo de ação tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese;
- ✓ Assume-se que independentemente da origem da β -glucana, cevada ou *Saccharomyces cerevisiae*, ela possui o mesmo mecanismo de ação e capacidade quimiopreventiva semelhante;
- ✓ Sistema-teste *in vitro* proficiente em metabolização (células HTC) demonstra que tanto o mecanismo de ação quanto a capacidade quimiopreventiva do polissacarídeo sofre interferência deste processo biológico;
- ✓ A metabolização da β -glucana pelas células HTC indica redução da sua capacidade quimiopreventiva e ineficiência no protocolo de pós-tratamento. Assim, este fato cria dúvidas a respeito da real atividade bioantimutagênica do polissacarídeo em estudo;
- ✓ Os estudos realizados com CHO-xrs5 confirmam a atividade do polissacarídeo por bioantimutagênese;
- ✓ Os testes de viabilidade celular indicam que a β -glucana melhora o índice de viabilidade celular devido sua capacidade de prevenir eventos de apoptose;
- ✓ O teste do cometa indica que a β -glucana não possui atividade antigenotóxica em sistema-teste *in vitro* com a linhagem celular CHO-k1;
- ✓ De acordo com os estudos *in vivo* a β -glucana não interfere na performance reprodutiva de camundongos fêmeas *Swiss (Mus musculus)* e no desenvolvimento da sua prole;
- ✓ Quando associada à ciclofosfamida apresenta uma boa capacidade antimutagênica em fêmeas grávidas e não grávidas independentemente das fêmeas grávidas se apresentarem mais susceptíveis a danos induzidos por este quimioterápico;

- ✓ Os efeitos teratogênicos induzidos por exposição aguda à ciclofosfamida não foram prevenidos de forma eficiente pela β -glucana, fato que indica baixo potencial na prevenção de malformações. No entanto, observou-se aumento da viabilidade fetal e redução das taxas de perda pós-implantacional e reabsorção demonstrando assim uma melhora do desempenho reprodutivo das fêmeas.

Diante de uma possível comprovação da eficiência desta molécula em prevenir danos genéticos em seres humanos e/ou a comprovação da mesma na melhoria da qualidade de vida de pessoas que possuem câncer ou que estão passando por processos de quimioterapia; a β -glucana poderá ser utilizada em larga escala na suplementação, principalmente, de pães e farináceos, que são de baixo custo e estão disponíveis para uma maior parcela da população. Ou ainda, esta substância poderá sair da classe de alimentos funcionais e se tornar um fármaco, que poderá ser utilizado na forma de cápsula e/ou soluções administradas por diferentes vias.

Ainda é prematura a finalização dos estudos com respeito ao mecanismo de ação do polissacarídeo β -glucana, bem como a sua indicação ou contra-indicação na quimioprevenção. Fazem-se necessários estudos bioquímicos que demonstrem melhor a estrutura do polissacarídeo em estudo e a sua interação com os agentes indutores de danos ao DNA, a fim de se esclarecer como realmente se efetiva a sua capacidade desmutagênica. Necessita-se, também, de um melhor entendimento de como este polissacarídeo pode interagir com o DNA ou com as enzimas envolvidas na replicação e no reparo do mesmo, para que se possa discutir sua capacidade bioantimutagênica.

No entanto, considera-se que a β -glucana é uma forte candidata a ser utilizada na prevenção de danos genéticos e como adjuvante nas quimioterapias às quais pacientes oncológicos são submetidos.

REFERÊNCIAS¹

- ALVES, I.; OLIVEIRA, N.G.; LAIRES, A.; RODRIGUES, A.S.; RUEFF, J.. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. **Mutagenesis**, v. 15, p. 229-234, 2000.
- ANDRADE, H. H. R.; ANDRADE, H. R.; REGULY, M. L.. Prevenção do câncer: o papel da dieta e da quimioprevenção. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 17, p. 369-384.
- AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D.. Carcinogens are mutagens. A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.70, p. 2281-2285, 1973.
- AMES, B.N.. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1983.
- AMES, B.N.. Carcinogens and anticarcinogens. In: SHANKEL, D.M.. **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms**. New York: Plenum, 1986, p. 7-35.
- ANDERSON, D. & PLEWA, M. J.. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67-73, 1998.
- ANDERSON, D.; YU, T.W.; MC-GREGOR, D.B.. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, p. 539-555, 1998.
- ASHBY, J.; TENNANT, R.W.. Definitive relationship among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. **Mutation Res.**, v. 257, p. 229-306, 1991.
- BAILEY, M.M.; SAWYER, R.D.; BEHLING, J.E.; BOOHAKER, J.G.; HICKS, J.G.; O'DONNELL, M.A.; STRINGER, K.R.; RASCO, J.F.; HOOD, R.D.. Incidence of specific cyclophosphamide-induced developmental defects in mice. **Birth Defects Res.**, v. 74, p. 261-267, 2005.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
Biosis. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

BARTSCH, H.; HIETEN, E.. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. **Environ. Health Perspect.**, v. 104, p. 569-577, 1996.

BARROW, M.V.; TAYLOR, W.I.. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. **J. Morphol.**, v. 127, p.291-306, 1969.

BELLINI, M.F.; GIACOMINI, N.L.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 465-469, 2003.

BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F; MATUO, R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro, impress**, 2005.

BORGES, V.C.. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D.L.. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001, cap. 96, p. 1495-1509.

BRUSICK, D.J.. **Principles of genetic toxicology**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1987, 284p.

CALDERON, I.P.M.. **Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabetes e gravidez**. [Dissertação de Mestrado] - Botucatu, SP: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Paulista, 1988.

CAMARGO, J.L.V; OLIVEIRA, M.L.C.S.; ROCHA, N.S.; ITO, N.. A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.40, p. 21-30, 1994.

CONNOR, J.M. & FERGUSON-SMITH, M.A.. eds. **Essential medical genetics**. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987.

CORTÉS, F.; DAZA, P.; PINERO, J.; ESCALZA, P.. Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. **Mutation Res.**, v. 24, p. 203-207, 1994.

CHORVATOVICOVÁ, D. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co⁶⁰ in mice, **Strahlenther. Onkol.**, v. 167, p. 612-614, 1991.

CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J.. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutation Res.**, v. 371, p. 115-120; 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. 83-89; 1998.

CISNEROS, R.L.; GIBSON, F.C.; TZIANABOS, A.O.. Passive transfer of poly-(1-6)-p-glucotriosyl-(1-3)-p-glucopyranose glucana protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2201-2205, 1996.

CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Res.**, v. 278, p. 8398, 1992.

DALY, A.K.; CHOLERTON, S.; GREGORY, W.; IDLE, J.R.. Metabolic polymorphisms. **Pharmac. Ther.**, v. 57, p. 129-160, 1993.

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

DEMLEITNER, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G.. Synthesis and antitumor activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan. **Carbohydr. Res.**, v. 226, p. 247-252, 1992.

DI LUZIO, N.R.; WILLIAMS, D.L.; MCNAMEE, R.B.; EDWARDS, B.F.; KITAHAMA, A.. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucana. **Int. J. Cancer.**, v.24, p. 773-779, 1979.

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.

ERIKSSON, U.J.; DAHLSTROM, E.; LARSSON, K.S.; HELLERSTROM, C Increased incidence of congenital malformations in the offspring of diabetic rats and their prevention by maternal insulin therapy. **Diabetes.** v. 31, p. 1-6, 1982.

ERIKSSON, R.S.M.; THUNBERG, L.; ERIKSSON, U.J.. Effects of interrupted insulin treatment on fetal outcome of pregnant diabetic rats. **Diabetes.** v. 38, p. 764-772, 1989.

ERIKSSON, U.J.; JANSSON, L.. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal developmental in the rat. **Int. Ped. Res.**, v. 18, p. 735-738, 1984.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K. L.. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FALCH, B.H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B.T.. The cytokine stimulating activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Res.**, v. 329, p. 587-596, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J.; TUNER, J.; BROWN, S.. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of method and results for hydrogen peroxide, **Mutagenesis**, v. 14, p. 605-612, 1999.

FENECH, M. & MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Res.**, v. 147, p. 29-36, 1985.

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

FERRARI, I.. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R.. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira, 1991, p.107-112.

FERRARI, C.K.B.. Oxidative stress pathophysiology searching for an effective antioxidant protection. **Int. Med. J.**, v. 8, p. 175-184, 2001.

FERRARI, C.K.B. & TORRES, E.A.F.S.. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Canc.**, v. 48, p. 375-382, 2002.

FLAGG, E.W.; COATES, R.J.; GREENBERG, R.S.. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 14, p. 419-427, 1995.

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W.. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.

GERBHART, E.. Antimutagens: data and problems. **Humangenetik**, v. 24, p. 1-32, 1974.

GIAVINI, E.; BROCCIA, M.L.; PRATI, M.; ROVERSI, G.D.; VISMARA, C.. Effects of streptozotocin-induced diabetes on fetal developmental of the rat. **Teratology**. v. 34, p. 8188, 1986.

GIBSON, G.R.. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1438-1441, 1999.

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.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAÚJO, I.B.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, S.N.; PAUMGARTTEN, F.J.R.. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by P-ionone. **Toxicology Letters.**, v. 138, p. 205-13. 2003.

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

GRÜTER, A.; FRIEDERICH, U.; WÜRGLER, F.E.. The mutagenicity of edible mushrooms in histidine-dependent bacterial test system. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 29, n.3, p. 159-165, 1991.

GUTERREZ, Z.R.; MANTOVANI, M.S.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; JORDÃO, B.Q.. Variation of antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 301-309, 2004.

HANSEMAN, J.K. & HOGAN, M.D.. Selection of the experimental unit in teratology studies. **Teratology**, v. 12, p. 165-72, 1995.

HARTMAN, P. E. & SHANKEL, D. M.. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Envir. Molec. Mutagenesis**, v. 15, p. 145-182, 1990.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y., SOFUNI, T.; ISHIDATE Jr., M.. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Res.**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HAYES, R.B.. Genetic susceptibility and occupational cancer. **Med. Lav.**, v. 86, p. 20613, 1995.

HOFER, M. & POSPISIL, M.. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 19, p. 607-609, 1997.

HOLBROOK, T.W.; COOK, J.A.; PARKER, B.W.. Immunization against *Leishmania* *dovavani*: glucana as an adjuvant with killed promastigotes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, p. 762-768, 1981.

HUFF, J.; HASEMAN, J.; HALL, D.. Scientific concepts, value, and significance of chemical carcinogens studies. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 31, p. 621-652, 1991.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Statistical Methods in Cancer Research. Volume III. GART, J.J.; KREWSKI, D.; LEE, P.N.; WAHRENDORF, J.. **The design and analysis of long-term animal experiments**. IARC Scientific Publication n° 79, IARC, Lyon, 1986: 219p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Overall evaluations of carcinogenicity**: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Supplement 7, 1987: 440p.

ISHIDATE M.Jr.; HARNOIS, M.C.; SOFUNI, T.. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. **Mutation Res.**, v. 195, p. 151-123, 1988.

JOHNSTON, P. J.; STOPPARD, E.; BRYANT, P. E.. Induction and distribution of damage in CHO-K1 and the X-ray-sensitive hamster cell line xrs5, measured by the cytochalasin-B-cytokinesis block micronucleus assay. **Mutation Res.**, v. 1, n. 385, p.1-12, 1997.

JOHNSTON, P. J.; MACPHAIL, S. H.; STAMATO, T. D.; KIRCHGESSNER, C. U. ; OLIVE, P. L.. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. **Radiation Res.**, v. 149, p. 455-462, 1998.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N.. Environmental desmutagens and antidesmutagens. In: KLEKOWSKI, E.J.. ed. **Environ Mutag Plant Biol**. New York: Praeger; 1982: 137-51.

KADA, T.; KANEKO, K.; MATSUZAKI, S.; MATSUZAKI, T.; HARA, Y.. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. **Mutation Res.**, v. 150, p. 127-132, 1985.

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

KAISER, A.B. & KERNODLE, D.. Synergism between poly-(1→6)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranose glucana and cefazolin in prophylaxis of staphylococcal wound infection in a guinea pig model. **Antimicrobiol. Agents Chemoth.**, v. 42; p. 2449-2451, 1998.

KANENO, Y.; CHIHARA, G.; TAGUCHI, T.. Activity of lentinan against cancer and AIDS. **Int J. Immunother.**, v. 4, p. 203-213, 1989.

KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; BOONE, C.W.; MALONE, W.A.; HAW, E.T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J.A.; KOPELOVICH, L.; ALI, T.; VINER, J.L.; SIGMAN, C.C.. Progress in cancer chemoprevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 889, p. 1-13, 1999.

KIRSCH-VOLDERS, M. & FENECH, M.. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokines block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 51-58, 2001.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Res.**, v. 278, p. 205-208, 1992.

KISHIDA, E.; SONE, Y.; MISAKI, A.. Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1,3)-β-D-glucan. **Carbohydr. Polymers.**, v. 17, p. 89-95, 1992.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G.. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KLEINER, S.M.. **Defense plants:** foods that fight disease. 28 set. 1997. Disponível em: <<http://www.physsportsmed.com>>. Acesso em: 28 set. 1998.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A. comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KOCHHAR, D.M.. Limb developmental in mouse embryos. In: Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. **Teratology**, v.7, p. 289-298, 1973.

KOGAN, G.; SANDULA, J.; KOROLENKO, T.A.; FALAMEEVA, O.V.; POTERYAEVA, O.N.; ZHANAEVA, S.Y.; LEVINA, O.A.. Increased efficiency of lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator - yeast carboxymethyl glucana. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 2, p. 775-781, 2002.

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

KRISHNA, G. & HAYASHI, M.. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Res.**, v. 455, p. 155-166, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

LUIZ, R. C.. **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro.** 2002. Dissertação [Mestrado] - Instituto Agronômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LUIZ, R.C.; JORDÃO, B.Q.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.. Mechanism of clastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K¹) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mutation Res.**, v. 528, p. 75-79, 2003.

LUIZ, R.C.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.. Non-mutagenic or genotoxic effects of medicinal aqueous extracts from the *Agaricus blazei* mushroom in V79 cells. **Cytologia**, v. 68, p. 1-6, 2003.

MACHADO, M.P.; RODRIGUES-FILHO, E.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 533-539, 2005.

MACKELVEY-MARTIN, V.M.; HO, E.T.S.; MCKEOWN, S.R.; JOHNSTON, S.R.; MCCARTHY, P.J.; RAJAB, N.F.; DOWNES, C.S.. Emerging applications of the single gel electrophoresis (comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. **Mutagenesis**, v.13, n.1, p.1-8, 1998.

MAEDA, Y.Y.; TAKAHAMA, S.; KOHARA, Y.; YONEKAWA, H.. Two genes controlling acute phase responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. **Immunogenetics**, v. 43, p. 215-219, 1996.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B.. Biomonitorização do dano genético em humanos. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 9, p. 183-203.

MANSON, J.M.; ZENICK, H.; COSTLOW, R.D.. Teratology test methods for laboratory animals. In: HAYVES, A.W. ed. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press; 1982, p. 141-184.

MANSON, J.M. & KANG, Y.J.. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYVES, A.W.. ed. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press; 1994, p. 989-1037.

MASIHI, K.N.. Immunomodulators in infectious diseases panoply of possibilites. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 22, p. 1083-1091, 2000.

MATTER, B. & SCHIMID, W.. Trenimon-induced chromosome damage in bone-marrow cells of six mammalian species evaluated by the micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 12, p. 217-225, 1971.

MATSUOKA, A.; OZAKI, M.; TAKESHITA, K.; SAKAMOTO, H.; GLATT, H. R.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.. Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. **Mutagenesis**, v. 12, p. 365-372, 1997.

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

McGAHON, A.J.; MARTIN, S.J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUDI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R.. The end of the (cell)line: Methods for the study of apoptosis in vitro. In: SCHURARTZ, L.M. & OSBOURNE, B.A.. eds. **Methods in cell biology**. Academic Press. v.46, 1995, p.153-184.

MEIRA, D.A.; PEREIRA, P.C.M.; MARCONDES-MACHADO, J.; MENDES, R.P.; BARRAVIERA, B.; PELLEGRINO, J.R.J.; REZKALLAH-IWASSO, M.T.; PERACOLI, M.T.S.; CASTILHO, L.M.; THOMZAINI, I.; SILVA, C.L.; FOSS, N.T.; CURRI, P.R.. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 496-503, 1996.

MENOLI, R.C.R.N.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B.Q.. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. **Mutation Res.**, v. 496, p. 5-13, 2001.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.; NAGEL, P.. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cell of zebra mussels, *Dreissenapolyomorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Res.**, v. 371, p. 47-55, 1996.

MILLER, B.; ALBERTI, S.; LOCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E.. Compative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Res.**, v. 192; p. 45-59, 1997.

MILNER, J.A.. Functional foods and health promotion. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1395-1397, 1999.

MIRKES, P.E.. Cyclophosphamide teratogenesis: a review. **Teratog. Carcinog. Mutag.**, v. 5, p. 75-88, 1985.

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

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

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

OLIVEIRA, R, J.. **Possível efeito do tratamento de ratas prenhes com doses altamente diluídas de arsênio na prevenção da teratogenicidade deste metal**. 2001. 233f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

OLIVEIRA, J.M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; MANTOVANI, M.S.. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1775-1780, 2002.

PATCHEN, M.L.; D'ALESSANDRO, M.M.; BROOK, I.; BLAKELY, W.F.; MAC VITTIE, T.J.. Glucan: mechanisms involved in its radioprotective effect. **J. Leukocyte Biol.**, v. 42, p. 95-105, 1987.

PATCHEN, M.L. & MAC VITTIE, T.J.. Dose-dependent responses of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of immunomodulating agent glucana. **Immunopharmac.**, v. 5, p. 303-313, 1983.

PATCHEN, M.L. & MAC VITTIE, T.J.. Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice. **Int. Soc. Immunopharmac.**, v. 7, n.6, p. 923-932, 1985.

PERSAUD, T.V.N.. ed. **Environmental causes of human birth defects**. Springfield: Charles C Thomas; 1990.

POERSCH, A.. **Atividade protetora da DCTN (trans-desidrocrotonina) na frequência de micronúcleos e apoptose induzidos por diferentes agente mutagênicos in vitro.** 2005. Dissertação [Mestrado] - Instituto Agrônomo do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; MCFEE, A. F.. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Res.**, v. 189, p. 175-183, 1987.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAITÓ, H.; YOSHIOKA, Y.; USHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y.. Relationship between conformation and biological response for (163)-(3-D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus ameobocyte ysate and host-mediated antitumor. **Carbohydr. Res.**, v. 217, p. 181-190, 1991.

SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S.. Clastogenic action of ellipticine aver the cell cycle of human lymphocytes and influence of port-treatments with caffeine and ara-C at G2. **Mutation Res.**, v. 248, p. 195-202, 1991.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M.. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.. **Mutagénesse Ambiental.**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 8, p. 201-219.

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. 323-326, 1995.

SANTOS, H.S. & CRUZ, W.M.S.. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Rev. Bras. Canc.**, v. 47, p. 303-308, 2001.

SASAKI, Y.F.; SAKAGUCHI, M.; YAMAGISHI, T.; YAMADA, H.; SHIRASU, Y.. Bio-antclastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil-docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid - in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Res.**, v. 320, p. 9-22, 1994.

SCHIMID, W.. The micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHUBERT, J.. Prevention of experimentally induced cleft palate in mice. **Cleft Palate J.**, v. 19, p.83-88, 1982.

SIES, H.. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1999.

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.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, 184-191, 1988.

SLAMENOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P.. Protective effects of fungal (1—3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Let.**, v. 198, p. 153-160, 2003.

SNUSTAD, D. P. & SIMMONS, M. J.. **Fundamentos de Genética**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 756p.

SOARES, R.M.D.; DE-SÁ, R.M.; FRANCISCO, A.; OGLIARI, P.. **Avaliação do conteúdo de beta-glucanas em novos cultivares brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare L.*)**. Brasília: 52º Reunião Anual da SBPC, 2000. Disponível em: <<http://www.ufsc.br>>. Acesso em: 25 jul. 2004.

SOLTYS, J.; BENKOVÁ, M.; BOROSKOVÁ, Z.. Immunorestorative effect of glucan immunomodulator on guinea pigs with experimental ascariasis. **Vet. Immunol. Immunop.**, v. 42, p. 379-388, 1994.

SOLTYS, J.; BOROSKOVÁ, Z.; DUBINSKY, P.; TOMASOVICOVÁ, O.; AUER, H.; ASPOCK, H.. Effect of glucan immunomodulator on the immune response and larval burdens in mice with experimental toxocaris. **Appl. Parasitol.**, v. 37; p. 161-167, 1996.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A.. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicol. Let.**, v. 88, p. 91-98, 1996.

SPEIT, G. & HARTMANN, A.. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203-211, 1999.

STAHLMANN, R.; BLUTH, U.; NEUBERT, D.. Effects of the cyclophosphamide metabolite acrolein in mammalian limb bud cultures. **Arch. Toxicol.**, v. 57, p. 163-7, 1985.

STAPLES, R.E. & SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal boné. **Stain Technol.**, v. 39, p. 61-3, 1964.

STOPPER, H.; FULL, M.; HELBIG, R.; SPEIT, G.. Micronucleous induction by neocarzinostati and methylmethanesulfonate in ionizing radiation-sensitive chinese hamster V79 cell mutants. **Mutation Res.**, v. 383, p.107-112, 1997.

SURH, Y.J.; SHLYANKEVICH, M; LEE, J.W.; YOO, J.K.. Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo[a] pyrene y isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. **Mutation Res.**, v. 367, p. 219-224, 1996.

TAKAHASHI, H.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T.. Association of immunological disorders in tethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. **Immun. Med. Microb.**, v. 31, p. 1-14, 2001.

TAKAHASHI, C. S.. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidias. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. & MARQUES, E. K.. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, cap. 6, p. 151-168.

TAYLOR, P.. ed. **Practical teratology**. New York: Academic Press; 1986.

THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F.. eds. **Thompson & Thompson genetics in medicine**. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.

TICE, R. R.. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D.H. E VENITT, S. **Environmental Mutagenesis**, Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995, p. 315-339.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.. The single cell gel/ comet assay: guidelines for *in vitro* e *in vivo* genetic toxicology testing. **Mutation Res.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TOHAMY, A.A.; EL-GHOR, A.A.; EL-NAHAS, S.M.; NOSHY, M.M.. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. **Mutation Res.**, v. 541, p. 45-53, 2003.

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

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

TRUCKER, J.D. & PRESTON, R.J.. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Res.**, v.365, p. 147-159, 1996.

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

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

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

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

VUKICEVIC, V.; KAMPFINGER, K.; STOPPER, H.. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency, *Toxicology Letters*. v. 147, p. 187-95, 2004.;

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

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

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

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

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

ZEIGER, E.. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity . **Cancer Res.**, v. 47, p. 1287-1296, 1987.

ZHANG, S.; HUNTER, D.J.; FORMAN, M.R.; ROSNER, B.A.; SPEIZER, F.E.; COLDITZ, G.A.; MANSON, J.E.; HANKISON, S.E.; WILLETT, W.C.. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 547-556, 1999.

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

ANEXOS

Anexo 1 - Manuscript Submission for CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *Cell Biology and Toxicology* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://cbto.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for *Cell Biology and Toxicology* offers easy and straightforward log-in and submission procedures.

This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

You should supply the electronic versions of your figures. We prefer figures in TIFF, EPS, PS, PDF and Microsoft® Office format. Be aware that we may not be able to use other file formats and that the hard copy may be scanned instead. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica. Figures should be saved in separate files. The figure legends should be included in the text file.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Manuscript Preparation

The manuscript should be arranged in the following order (typed capital + lower case):

Title page

- Title (the title should be as short as possible, but should contain adequate information regarding the contents).
- Subtitle (this may be used to supplement and thereby shorten an excessively long main title).
- Author's full name(s) (if more than one, use 'and' before the last name).
- Affiliation(s)/Address(es).
- Mailing address for corresponding author.

Key words/Abstract/Abbreviations

- Key words (maximum of 6, in alphabetical order, suitable for indexing).
- Abstract (brief and informative, not to exceed 250 words).
- Abbreviations (arranged alphabetically, only those which are not familiar and/or commonly used).

Main text

- The relative importance of headings and subheadings should be clear.
- The approximate location of figures and tables should be indicated in the margin.
- New paragraphs should be indicated by clear indentation.
 - The use of footnotes should be avoided. However, if essential, they should be typed on the appropriate page, but clearly separated from the text with a line above them.
 - Mathematical formulas should have a clarification of all symbols and an accompanying 'translation' of the meanings, e.g. 'this formula shows that when the highly variable factor ρ is found to exceed unity, the viscosity of the medium β is no longer significant'.

Style manuals

The following three books are recommended as guides in writing scientific papers:

- Council of biology editors style manual. A guide for authors, editors and publishers in the biological sciences, 4th edn., Bethesda MD: Council of Biology Editors; 1978.
- O'Connor M, Woodford FP, eds. Writing scientific papers in English, Amsterdam: Elsevier; 1976.
- Reynolds L, Simmonds D. Presentation of data in science.

Publications, slides, posters, overhead projectors, tapeslides, television. The Hague: Martinus Nijhoff; 1983.

Abbreviations and units

Only SI units and abbreviations should be used although some quantities may be given in common units, e.g. mmHg. Abbreviations should be defined in full as mentioned above under item 2. Whenever in doubt use SI (Système International) units.

Acknowledgements

To assistants, grants, funding bodies etc. Please make sure that any persons acknowledged consent to their names appearing.

References

- References should be cited according to the author/date (Harvard) system, i.e. (Smith, 1993; Smith and Jones, 1993; Smith et al, 1993a).

Citations of personal communications and unpublished data should be avoided unless absolutely necessary. When used, such citations should appear in the text only, e.g. '(E.D. Smith, personal communication)', and not in the reference list.

- Abbreviate titles of periodicals according to the style of Index Medicus.
- References should be listed in alphabetical order and styled according to the following examples (Vancouver style):

Chapter in book: Bauer RB. Mechanical compression of the vertebral arteries. In: Berguer R, Bauer RD, eds. Vertebrobasilar arterial occlusive disease: medical and surgical management. New York: Raven Press; 1984: 45-71.

Article in periodical: Du Doulay G, Shar SH, Currie JC, Logue V. The mechanism of hydromyelia in Chiari type 1 malformations. Br J Radiol. 1974; 74: 579-87.

Book: Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Revised edn. New York: Academic Press; 1977: 217-48.

Do not use italics in titles of articles or books.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labeled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size.

Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal.

Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Colour Illustrations

Up to two (2) colour pages (irrespective of the number of individual figures on them) will be published free of charge if the Editor and Referees consider this essential. Additional colour pages will be charged accordingly.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Please do not make any corrections to the PDF file.

Minor corrections (+/- 10) should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@springer-sbm.com. Always quote the four-letter journal code and article number and the PIPS No. from your proof in the subject field of your e-mail.

Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas).

Offprints

Ordering information for offprints will be sent with the proofs.

Page charges

No page charges are levied for this journal.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in

addition is made available publicly through Springers online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springeronline.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Additional Information

Cell Biology and Toxicology

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Fax: +31-78-6576254

<http://www.springeronline.com>

Anexo 02 - Manuscript Submission for TOXICOLOGY IN VITRO

General Information

The Journal's main purpose will be the publication of **papers** reporting and interpreting original toxicological research involving the application or development of in vitro techniques. **Brief Communications** documenting important new findings warranting expeditious publication will also be considered, as will concise interpretative **Reviews** of toxicological topics of contemporary significance. **Letters to the Editor** will be limited to comments on contributions already published in the Journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution.

Submission of a paper will be held to imply that it reports original unpublished research, that it is not under consideration for publication elsewhere, that all authors approve of the submission, and that, if accepted for Toxicology in Vitro, it will not be published again, either in English or in any other language, without the Editors' consent.

Conflict of Interest and Source of Funding. A conflict of interest exists when an author or the author's institution has a financial or other relationship with other people or organizations that may inappropriately influence the author's actions. All submissions to Toxicology in Vitro must include disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. Toxicology in Vitro may use such information as a basis for editorial decisions and may publish such disclosures if they are believed to be important to readers in judging the article.

Conflict of Interest Statements for Authors. At the end of the text, under a subheading "Conflict of Interest Statement", all authors must disclose any financial, personal, or their relationships with other people or organizations within 3 years of beginning the work submitted that could inappropriately influence the work submitted. Examples of conflicts include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. Investigators should disclose potential conflicts to participants in clinical trials and other studies and should state in the manuscript whether they have done so. *Toxicology in Vitro* may decide not to publish on the basis of a declared conflict, such as the financial interest of an author in a company (or its competitors) that makes a product discussed in the paper.

Role of the Funding Source. All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text. Authors must also describe the role of the study sponsor(s), if any, in a study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the study sponsor(s) had no such involvement, the authors should so state.

Manuscript Submission

Manuscripts must be submitted for review via the Internet through the Author Gateway on the Elsevier website (☞ <http://authors.elsevier.com>). Submissions that are e-mailed, or mailed, to the editors will not be considered. Questions about submissions may be directed to the appropriate editor.

Americas and Canada: daniel.acosta@uc.edu

Europe: b.blauboer@iras.uu.nl

All other areas of the world: daniel.dietrich@uni-konstanz.de

Language Editing: International Science Editing and Asia Science Editing can provide English language and copyediting services to authors who want to publish in scientific, technical and medical journals and need assistance before they submit their article or before it is accepted for publication. Authors can contact these services directly: International Science Editing (☞ <http://www.internationalscienceediting.com>) and Asia Science Editing (☞ <http://www.asiascienceediting.com>) or, for more information about language editing services, please contact authorsupport@elsevier.com who will be happy to deal with any questions.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms and conditions (http://authors.elsevier.com/terms_and_conditions.html).

Manuscript Format

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible submissions will be returned to authors for revision. All pages must be numbered, including the *Title Page*, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, the names and address of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated) and a short running title not exceeding 45 letters and spaces. Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable.

Revised versions

The medium of submission for revised papers is electronically through the Author Gateway on the Elsevier website (✉ <http://authors.elsevier.com/toxinvit>). Figures should be submitted as original high quality files of a standard graphics program. Revised versions should be returned within 3 months of the first date of decision. Failure to do so will result in any resubmission being treated as a new version and will therefore carry a new date of receipt.

Address

Authors' full names, academic or professional affiliations and addresses should be included on the first page. The name and complete address and e-mail address of the author to whom any correspondence is to be sent should be given.

Manuscripts of original papers should be organized into the following sections, each commencing on a separate sheet:

Abstract-a self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

Introduction-a concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

Materials and Methods-a detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well-established methods and techniques may be identified by reference only.

Results-presented concisely with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

Discussion-a succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comments are discouraged.

Acknowledgements-providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

References-listed strictly in alphabetical order and including the names of all authors of the cited work. References to published papers should provide authors' names and initials, year

of publication, full title of the paper, title of the journal (in full), volume number, and the first and last page numbers of the paper:

e.g. Wright, A., Cowie, H., Gormley, I.P., Davies, J.M.G., 1986. The in vitro cytotoxicity of asbestos fibres: 1. P388D1 cells. *American Journal of Industrial Medicine* 9, 371-384.

References to books should include authors' names and initials, year of publication, title, edition, appropriate page number(s) and name and location of the Publisher:

e.g. Foussereau, J., Benezra, C., Maibach M., 1982. Occupational Contact Dermatitis. *Clinical and Chemical Aspects*. Munksgaard, Copenhagen, p. 227.

For multi-author books, the names and initials of the relevant authors, year of publication, title of the relevant chapter, title of the book, names and initials of all editors, numbers of first and last pages of the cited chapter and name and location of the Publisher should be given:

e.g. Mather, J.P., Phillips, D.M., 1984. Primary culture of testicular somatic cells. In: Barnes, D.W., Sirbasku, D.A., Sato, G.H. (Eds.), *Methods for Serum-free Culture of Cells of the Endocrine System*. Alan R. Liss, New York, pp. 29-45.

Citations of references in the text should give the surname(s) of the author(s), together with the year of publication. For references with more than two authors, the name of the first followed by et al. should be cited. For papers with the same author(s) and year, the references should be distinguished in the text and reference list by the letters a, b etc. following the year (but still in alphabetical order). Authors names must not be typed in upper case letters in either text or reference list.

References may be listed if they are in press, but the journal that has **accepted** the paper for publication must be identified. Submitted papers or papers in preparation should not be listed; such work should be mentioned in the text only, as 'unpublished data' or 'personal communication' (with surnames, initials and year).

These sections should be followed by the tables in numerical order, each on a separate sheet, and finally by a typed list of the legends to the figures (see below).

Tables and Figures

These should be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. Tables and figures should be numbered, in arabic numerals, in the

sequence in which they are mentioned in the text. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein. Each figure should be in one of the following preferred formats: TIFF, JPEG, PDF, and EPS. Please refer to <http://www.elsevier.com/locate/artwork> for detailed instructions on preparing electronic artwork. No information that can be included in the legend should appear on the figure and the following standard symbols are preferred for line drawings: (closed triangle), (open triangle), (closed square), (open square), (closed circle), (open circle), (open circle with a dot in the middle), +, (open diamond). The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. Authors should bear in mind that the figures they submit may be subjected to photographic reduction. The cost for illustrations in colour will be the responsibility of the contributor(s) (an estimate may be obtained from the Editorial Offices). If figures that have already been published under copyright are to be reproduced in the Journal (e.g. in reviews), copies of letters from the first publisher and the original author giving permission for such reproduction must always accompany the submitted manuscript.

Footnotes

These should include the definitions of any abbreviations used in the text and any author's current address, if different from that on the title page. Other footnotes, as distinct from literature references, should be avoided in the text as far as possible. When they are essential, they should be identified by the symbols * † ‡ § ¶ in that order. All the footnotes except those for tables should be typed on a separate sheet, with an indication of the manuscript page to which the footnote refer.

Nomenclature

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers.

Abbreviations

These should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under Abbreviations as a footnote to the title page (see above).

Proof reading

Proofs will be supplied electronically for the author to check for typesetting accuracy. Only printer's errors may be corrected; no changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Toxicology in Vitro has no page charges.

Reprints

A total of 25 reprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at prices shown on the reprint order form which will be sent to the author. US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Anexo 03 – Manuscript Submission for REPRODUCTIVE TOXICOLOGY

Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that they have not been published elsewhere except in abstract form and are not concurrently under review elsewhere.

Online submission of papers

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EESubmit submission tool at <http://www205.ees.elsevier.com/rtx/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply, which incorporates the manuscript number for future correspondence.

Offline submission of papers

For those authors unable to submit their manuscript electronically, manuscripts should be sent in triplicate to the editorial office closest to the contributor:

Dr Thomas B. Knudsen, University of Louisville, Birth Defects Center, Room 301, 501 South Preston Street, Louisville, KY 40202, USA. Tel.: (+1) 502 852 7507 or -4128; Fax (+1) 502 852 4702;

Dr. W.S. Webster, Department of Anatomy, University of Sydney, N.S.W. 2006, Australia.

Full-length papers should be submitted in English with an abstract briefly summarizing the essential contents. The original manuscript (including figure captions and references) and 2 *complete copies* of the manuscript and figures should be submitted with one set of camera-ready figures or photographs (original artwork or glossy prints). Manuscripts should be accompanied by (a) a cover letter including the name, address, E-Mail Address, FAX number, and phone number of the author to whom correspondence should be sent; (b) copies of any published reports that may duplicate material in the submitted manuscript; and (c) written permission of author(s), and publisher(s) to use any previously published

material (figures, tables, or quotations of more than 100 words). Authors should retain an additional copy of the manuscript and figures for their own files. Upon acceptance of a manuscript for publication, a copyright transfer will be sent to the author(s). This transfer must be signed and dated by all authors and returned to the Editor-in-Chief. **The corresponding author of each article will receive 25 complimentary reprints.**

Letters to the Editor. Letters dealing with published articles or matters of interest to the reproductive toxicology field are invited. Letters should be short (not more than 400 words), typed double-spaced, and should include references where appropriate. Where a published article is involved, the original author(s) will be invited to submit a response.

Reviews and Book Reviews. Authors are invited to submit suggestions for subject reviews and book reviews to the Editorial Office. Please contact the Editorial Office before beginning work on review articles.

MANUSCRIPT PREPARATION

The journal generally conforms to the *CBE Style Manual* (5th ed.) by Council of Biology Editors, Inc. (Council of Biology Editors, Inc., Bethesda, MD 20814 USA; 1983). Organize the manuscript in the order indicated below, with each component beginning on a separate page and with a running title and page number typed in the upper right-hand corner of each page.

Submission on Disk after Acceptance for Publication. Elsevier now publishes all manuscripts using electronic production methods and strongly encourages submission on disk. Please send the electronic files of your article along with the hardcopy of the accepted version. To ensure fast and easy processing of your submission, please adhere to the following guidelines:

1. Save text and graphics on separate disks.
2. Label all disks with your name, a short version of the article title, the journal to be published in, and the filenames. Please also include details of the software and platform (PC, Mac, UNIX etc) used to create your files.
3. Ensure that the files on the disk match the hardcopy exactly. In cases of a discrepancy, the hardcopy version will be used as the definitive version.

Electronic Submission of Artwork and Graphic files. The following are preferred formats: TIFF (1-bit for line art, 8-bit for greyscale, and 24 (32)-bit for colour images) and EPS (PS or PDF). You may also supply in the following native formats: Adobe Photoshop[®], Adobe Illustrator[®], CorelDRAW[®], Macromedia[®] FreeHand[®] and CS ChemDraw[®]. Bitmap and vector graphics should be supplied separately together with instructions on the composition of the image. All graphic files must be submitted in sufficiently high resolution (300 x 300 dpi for grayscale or colour images and 1000 X 1000 dpi for line art) to allow for printing. All fonts used in studio created artwork must be either "embedded" in the file or supplied separately. For further details please see <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork> .

Title Page. Page 1 should include: (a) the title of the article; (b) the authors' full names (First name, middle initial(s), surname); (c) affiliations (the name of department (if any), institution, city, and state or county where the work was done), indicating which authors are associated with which affiliations; (d) acknowledgments of grant support and of individuals who were of direct help in the preparation of the study; (e) the name, address, E-Mail Address, FAX number, and telephone number of the author to whom reprint requests are to be sent; and (f) running title (not more than 30 spaces).

Abstract and Key Words. Page 2 should include the title of the article followed by the abstract, which should have no more than 150 words. The abstract should state the purpose of the study, basic procedures, most important findings, and principal conclusions, with an emphasis on the new aspects of the study. Following the abstract, list 8 key words or phrases for indexing. Abstracts are not used in review articles.

Text. All manuscripts should be typed on one side of the paper, double-spaced, with wide margins. Papers should be organized in the following format: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References. Review articles may be organized without these headings and will be edited to correspond to our standard format.

References. Type references double-spaced in Vancouver numbered style (number them consecutively in the order in which they are first mentioned in the text, *not alphabetically*). Identify references in the text, tables, and legends by arabic numerals typed in parentheses. References with 7 or more authors may be truncated, using the first 3 names with et al. Examples of reference style are as follows:

Journal:

[3] Kao J, Brown NA, Schmid B, Goulding EH, Fabro S. Teratogenicity of valproic acid: in vivo and in vitro investigations. *Teratogenesis Carcinog Mutagen*. 1981;1:367-83.

Contribution to a book:

[7] Scialli AR, Fabro S. The toxicokinetics of anesthetics and analgesics during labor and delivery. In: Scanlon JW, ed. *Perinatal anesthesia*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1985:1726.

Book:

[4] Fabro S, Scialli AR, eds. *Drug and chemical action in pregnancy*. New York: Marcel Dekker; 1986.

Letter:

[5] Fabro S, Brown NA. Teratogenic potential of anticonvulsants [letter]. *N Engl J Med*. 1979;300:1280-1.

Footnotes. Footnotes should be indicated in text by *, [†], etc., but should be typed at the end of the reference list and keyed to the appropriate manuscript page.

Tables. Every table and every column should be provided with an explanatory heading, with units of measure clearly indicated. The same data should not be reproduced in both tables and figures.

Figures. Figures should be professionally drawn and photographed. Three prints of each should be submitted as glossy, highcontrast, black-and-white photographs. Photographs of tissues, cells, or subcellular components should be included when they are essential. Use a label on the back of each figure to indicate the article's title and the top of the figure. Do not write directly on the back of the photographs. Do not trim, mount, clip, or staple the illustrations. Securely package all artwork in a protective envelope.

Figure Legends. Legends should be typed double-spaced and numbered with arabic numerals corresponding to the illustrations and submitted on a separate page. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, each

should be explained clearly in the legend. For photomicrographs, the internal scale markers should be defined and the method of staining should be given. If the figure has been previously published, a credit line should be included and a permission letter supplied by the authors.

Author enquiries: For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Author Gateway from Elsevier Science at <http://authors.elsevier.com> . The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Author corrections: Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. *Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in ONE communication.* Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (" Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded

fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.